



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS

BRUNA FRIZZO RABELO

QUANTIFICAÇÃO DE MICRORNA NO ENCÉFALO DE RATOS DO MODELO
ANIMAL DE AUTISMO INDUZIDO POR EXPOSIÇÃO PRÉ-NATAL AO ÁCIDO
VALPROICO E ANÁLISE *IN SILICO* DE SEUS ALVOS BIOLÓGICOS

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Porto Alegre

2020



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS

Quantificação de microRNA no encéfalo de ratos do modelo animal de autismo induzido por exposição pré-natal ao ácido valproico e análise *in silico* de seus alvos biológicos

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Neurociências da Universidade
Federal do Rio Grande do Sul como
requisito parcial à obtenção do grau
de Mestra em Neurociências.

BRUNA FRIZZO RABELO

ORIENTADORA: Prof.^a Dr.^a Carmem Juracy Silveira Gottfried

Porto Alegre

2020

Agradecimentos

Agradeço, primeiramente, a minha orientadora Carmem por ter aberto as portas do seu laboratório para mim, mesmo sem me conhecer, por ter acreditado em mim e por ter me dado a chance de fazer parte dessa equipe incrível que ela formou nesses anos como pesquisadora. Agradeço por dividir o teu conhecimento e ideias comigo e por fazer eu me sentir acolhida em um ambiente que era tão estranho para mim a princípio. Obrigada, Victorio, por ter me levado oficialmente para o laboratório e mesmo estando agora na terra da rainha por sempre ser essa pessoa prestativa e disposta a ajudar no que for preciso.

Aos meus colegas de laboratório, dizem que se você tem colegas de trabalhos legais a vida se torna muito mais fácil e eu posso afirmar categoricamente que isso é verdade! Obrigada por me fazerem eu me sentir aceita, por estarem junto comigo em todas as horas (boas e ruins), por fazerem até os experimentos de 12 horas agradáveis e por revezarem os surtos comigo para que sempre tivesse alguém consciente para dar os conselhos necessários ao outro.

Mell e Io, meus presentinhos da pós, obrigada por sempre me receberem com um sorriso no rosto, por ouvirem meus surtos e me acalmarem dizendo que tudo ia dar certo e me dando Coquinho. Sem a ajuda de vocês esse trabalho não teria saído. Júlio, Brum e Gui obrigada por sempre estarem animando o laboratório, seja com ótimas playlists musicais, com piadas sem graça ou com assuntos geeks. Gui Cordenonsi, obrigada por me aguentar nas intermináveis semanas de PCR no Vale e por sempre estar disposto a tirar minhas dúvidas quando eu precisei. Mauro e Bibi, que mesmo não estando mais no laboratório dividiram todo seu conhecimento comigo o que proporcionou a realização desse trabalho.

Aos meus amigos de Caxias: Mila, Brukie e Matheus, obrigada por não desistirem de mim! Mesmo quando eu deixava as mensagens de vocês no vácuo ou dava bolo nos compromissos porque tinha uma dissertação para escrever ou coisas do laboratório para analisar. Mesmo longe, saber que eu podia contar com o incentivo de vocês me dava forças para continuar.

Aos meus pais, pois sem o eterno incentivo deles eu não teria chegado onde estou hoje. Obrigada por sempre terem acreditado em mim e por terem tomado os meus sonhos como sonhos de vocês também e por terem feito de tudo para que eu pudesse realizá-los. Obrigada por serem meu porto seguro quando tudo dava errado e por não me deixarem desistir e me ensinarem a persistir.

Ao PPG Neurociências e as agências de fomento: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em NeurolimunoModulação (INCT-NIM) e Instituto AWARD.

“São as perguntas que não sabemos responder que mais nos ensinam.
Elas nos ensinam a pensar.
Se você dá uma resposta a um homem, tudo o que ele ganha é um fato qualquer.
Mas, se você lhe der uma pergunta, ele procurará suas próprias respostas.”

- Patrick Rothfuss

Resumo

O Transtorno do Espectro Autista (TEA) é uma desordem do neurodesenvolvimento com prevalência atual estimada em 1:59 crianças de até 8 anos de idade nos Estados Unidos. Segundo o DSM-5, o TEA é caracterizado por uma tríade comportamental, composta por prejuízos de comunicação e interação social, além da presença de comportamentos repetitivos ou estereotipados. A etiologia do TEA permanece pouco elucidada; porém, sabe-se que a exposição pré-natal a alguns fatores ambientais de risco durante a gestação, como o ácido valproico (VPA), podem contribuir para o desencadeamento desse transtorno. O modelo animal de autismo induzido pela exposição pré-natal ao VPA vem sendo usado para avaliar características comportamentais e moleculares comuns em pacientes com TEA. Além das avaliações comportamentais, existem evidências de que alterações nos níveis de microRNA específicos possam estar relacionados a distúrbios do neurodesenvolvimento. Sendo assim, a avaliação dessas moléculas no modelo VPA podem ajudar a entender a fisiopatologia da TEA. Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi avaliar um conjunto de microRNA (miRNA) em cinco diferentes regiões encefálicas (córtex pré-frontal medial, área somatossensorial, região da amígdala, hipocampo e cerebelo) no modelo animal de autismo induzido pela exposição pré-natal ao VPA. Além disso, foi feita uma busca por genes alvos dos miRNA alterados visando estabelecer possíveis associações com a fisiopatologia do TEA. Ratas Wistar prenhes receberam no dia E12,5 uma dose intraperitoneal (i.p.) de VPA (600 mg/kg) ou solução salina (0,9%). No dia pós-natal 42 (P42) os animais foram eutanasiados por sobredose anestésica de cetamina (300 mg/kg) e xilazina (40mg/kg). Após a decapitação, as estruturas encefálicas foram isoladas e homogeneizadas em reagente Trizol® para posterior extração de RNA total e quantificação de miRNA por RT-qPCR. Os alvos encontrados para estes miRNA alterados estão envolvidos com as vias de sinalização da mTOR e de Wnt, ambas previamente relacionadas com o TEA. Como conclusão, o presente trabalho amplia a compreensão da fisiopatologia do TEA e denota importantes moléculas-alvo com potencial para a busca de novas estratégias farmacológicas.

Palavras-chave: ácido valproico, autismo, microRNA, mTOR, PTEN, Wnt.

Abstract

Autism Spectrum Disorder (ASD) is a neurodevelopmental disorder with a current prevalence estimated at 1:59 children under the age of 8 in the United States. According to DSM-5, ASD is characterized by a behavioral dyad, composed of impaired communication and social interaction, in addition to the presence of repetitive or stereotyped behaviors. The etiology of ASD remains unclear; however, it is known that prenatal exposure to some environmental risk factors during pregnancy, such as valproic acid (VPA), can contribute to the onset of this disorder. The animal model of autism induced by prenatal exposure to VPA has been used to assess common behavioral and molecular characteristics in patients with ASD. In addition to behavioral assessments, there is evidence that changes in specific microRNA levels may be related to neurodevelopmental disorders. Therefore, the evaluation of these molecules in the VPA model can help to understand the pathophysiology of ASD. Thus, the objective of this work was to evaluate a group of microRNA in five different brain regions (medial prefrontal cortex, somatosensory area, amygdala region, hippocampus and cerebellum) in the animal model of autism induced by prenatal exposure to VPA. In addition, a search was made for altered microRNA target genes, aiming to establish possible associations with the pathophysiology of ASD. Pregnant Wistar rats received an intraperitoneal (i.p.) dose of VPA (600 mg/kg) or saline solution (0.9%) on day E12.5. On postnatal day 42 (P42) the animals were euthanized by anesthetic overdose of ketamine (300 mg/kg) and xylazine (40 mg/kg). After decapitation, the brain structures were isolated and homogenized in Trizol® reagent for posterior RNA extraction and microRNA quantification by RT-qPCR. The targets found for altered miRNA are involved with the mTOR and Wnt signaling pathways, both previously related to TEA. In summary, the present work expands the understanding of ASD pathophysiology and highlights important target molecules with the potential to search for new pharmacological strategies

Key words: autism, microRNA, mTOR, PTEN, valproic acid, Wnt.

Lista de siglas e abreviaturas

- ASSp – Área somatossensorial primária
- BDNF - Fator Neurotrófico Derivado do Encéfalo (do inglês, *Brain-derived neurotrophic factor*)
- Brn2 – ou POU3F2 (do inglês, *POU domain, class 3, transcription factor 2*)
- cDNA – DNA complementar
- Ce - Cerebelo
- COX-2 - Ciclooxygenase – 2
- CPFm – Córtex Pré-frontal medial
- DAAM - Do inglês, *Dishevelled Associated Activator Of Morphogenesis 1*
- Dvl – Do inglês, *Dishevelled*
- EBPA – Encontro Brasileiro para Pesquisa em Autismo
- (E/I) - Excitatório/inibitório
- F – Iniciador (do inglês, *Forward*)
- GS - Glutamina sintetase
- GSH - Glutathiona reduzida
- GSK3 β – Glicogênio sintase cinase (do inglês, *glycogen synthase kinase 3 beta*)
- GSKIP - Do inglês, *glycogen synthase kinase-3 β interacting protein*
- HDAC – Histona deacetilase, do inglês, *hystone deacetylase*
- MECP2 - Do inglês, *Methyl-CpG binding protein 2*
- miRNA – microRNA
- MMP9 - Metaloproteinase 9 de matriz (do inglês, *matrix metalloproteinase 9*)
- mTOR - Alvo da rapamicina de mamíferos (do inglês, *mammalian target of rapamycin*)
- p-Gsk3 β – Fosfo-Glicogênio sintase cinase (do inglês, *phospho- glycogen synthase kinase 3 beta*)
- pré-miRNA – Pré-microRNA
- PRICKLE - Do inglês, *prickle planar cell polarity protein*
- pri-miRNA - microRNA primário
- PSD-95 - Proteína da densidade pós-sináptica 95 (do inglês, *postsynaptic density protein 95*)
- PTEN - Homólogo de fosfatase e tensina (do inglês, *phosphatase and tensin homolog*)
- RAm – Região da Amígdala
- RISC - Do inglês, *RNA-induced silencing complex*
- RNAm – RNA mensageiro

RT-qPCR - Transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase em tempo real quantitativa (do inglês, *quantitative reverse transcription polymerase chain reaction*)

RTT – Síndrome de Rett

SEMA - Semaforina

SL – Grampo (do inglês, *steem-loop*)

SNC – Sistema Nervoso Central

SYN1 – Sinapsina (do inglês, *synapsin*)

RSV – Resveratrol

TEA – Transtorno do Espectro Autista

VPA – Ácido Valproico (do inglês, *valproic acid*)

Wnt – Do inglês, *Wingless-related integration site*

Lista de Figuras

Figura 1 – Biogênese de microRNA.....	21
Figura 2 – Representação do desenho experimental.....	25
Figura 3 – O grupo VPA apresenta diminuição de miR195-5p na região da amígdala.....	29

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Estimativa da prevalência de TEA no Brasil.....	12
Tabela 2 – Lista de microRNA com expressão alterada em indivíduos com TEA.....	23
Tabela 3 – Lista de sequências dos <i>primers forward</i> (F), <i>stem loop</i> (SL) e <i>primers</i> universal reversos usados para análise RT-qPCR.....	27

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	11
1.1.	Transtorno do Espectro Autista (TEA).....	11
1.2.	Dados epidemiológicos e diagnóstico	11
1.3.	Alterações neuroanatômicas envolvidas com a fisiopatologia do TEA	13
1.4.	Aspectos etiológicos do TEA	15
1.5.	Modelo animal de autismo induzido pela exposição pré-natal ao ácido valproico (VPA)	17
1.6.	microRNA.....	20
2.	OBJETIVOS.....	24
2.1.	Objetivo geral	24
2.2.	Objetivos Específicos.....	24
3.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	25
3.1.	Animais	25
3.2.	Modelo animal de autismo	25
3.3.	Coleta de tecidos, extração de RNA e RT-qPCR	26
3.4.	Primers	27
4.	RESULTADOS.....	29
4.1.	Análise molecular.....	29
4.2.	Análise da expressão de microRNA na região da amígdala	29
4.3.	Análise da expressão de microRNA na área somatossensorial primária	30
4.4.	Análise da expressão de microRNA no córtex pré-frontal medial	31
4.5.	Análise da expressão de microRNA no cerebelo	31
4.6.	Análise da expressão de microRNA no hipocampo	32
4.7.	Análise dos alvos proteicos	32
5.	DISCUSSÃO.....	33
6.	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	40
7.	CONCLUSÕES.....	43
8.	PERSPECTIVAS	44
9.	REFERÊNCIAS	45
10.	FIGURAS SUPLEMENTARES	57
10.1	Expressão de microRNA não alterados na região da amígdala	57
10.2	Expressão de microRNA não alterados na área somatossensorial primária	58
10.3	Expressão de microRNA não alterados no córtex pré-frontal medial	58
10.4	Expressão de microRNA não alterados no cerebelo.....	59
10.5	Expressão de microRNA não alterados no hipocampo	60
11.	ANEXO 1	61
	Carta de aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) Projeto 23884	61

1. INTRODUÇÃO

1.1. Transtorno do Espectro Autista (TEA)

O Transtorno do Espectro Autista (TEA) foi caracterizado primeiramente na década de 20 pela psiquiatra russa Grunya Sukhareva, que descreveu 6 crianças com características autistas (Zeldovich 2018), cujos sintomas incluíam “falta de expressividade facial e de movimentos expressivos, afastamento de seus semelhantes, fala de maneira estereotipada e interesses exclusivos” (Ssucharewa 1926). Atualmente, o TEA se enquadra entre os Transtornos do Neurodesenvolvimento e é caracterizado na clínica por alterações através de uma tríade exclusivamente comportamental que engloba:

- 1) Prejuízo na comunicação e interação social em múltiplos contextos, incluindo déficits em reciprocidade social, comunicação não-verbal utilizada para interação social e em habilidades para iniciar, manter e entender relacionamentos;
- 2) Comportamentos repetitivos, atividades e interesses restritos e estereotipados, além de inflexibilidade na rotina, insistência em hábitos e interesse incomum pelos aspectos sensoriais do ambiente.

Diversos outros sintomas e comorbidades são frequentemente associados ao TEA, como prejuízo intelectual (Bauman 2010; Mefford, Batshaw, and Hoffman 2012), impulsividade, déficit de atenção/hiperatividade, transtornos de ansiedade, problemas gastrointestinais (Bauman 2010), problemas de conduta, depressão, e do sono, epilepsia (Bill and Geschwind 2009; Klintwall et al. 2011; Silver and Rapin 2012), além de distúrbios hormonais e metabólicos (Bauman 2010), bem como alterações sensoriais em múltiplos contextos (Grandin 2009; Kern et al. 2007; Klintwall et al. 2011).

1.2. Dados epidemiológicos e diagnóstico

Segundo o último levantamento epidemiológico realizado no Estados Unidos em 2014 e publicado em 2018, a prevalência atual do TEA é de 1:59 em crianças até 8 anos de idade, sendo quatro vezes mais prevalente em meninos

do que meninas (Baio et al. 2018). Os dados epidemiológicos para TEA no Brasil ainda são escassos e, apesar de não haver dados estatísticos oficiais que possam evidenciar sua real prevalência, a Associação Brasileira do Autismo (ABRA n.d.) estima que existam aproximadamente 600 mil pessoas com TEA no Brasil. Uma estimativa mais recente feita por um dos maiores epidemiologistas no estudo do TEA, Eric Fombonne, durante sua estada no Brasil em 2010, sugere que tenhamos uma prevalência de 0,7% no Brasil (Tabela 1).

Tabela 1. Estimativa da prevalência de TEA no Brasil (2010)

		<u>Grupos de idade</u>				
		<u>0-4</u>	<u>5-9</u>	<u>10-14</u>	<u>15-19</u>	<u>≥20</u>
Urbana	População	12.749.346	12.787.933	13.509.943	14.401.006	53.448.228
	Estimativa	89.245	89.516	94.570	100.807	374.138
Rural	População	3.636.893	3.788.326	3.843.740	3.548.282	14.817.241
	Estimativa	25.458	26.518	26.906	24.838	103.720
Brasil	População	16.386.239	16.576.279	17.353.683	17.949.289	68.265.490
	Estimativa	114.704	116.034	121.476	125.645	477.858

Prevalência estimada em 0,7%

Fonte: Apresentação do Epidemiologista Eric Fombonne durante sua participação no Primeiro Encontro Brasileiro para Pesquisa do Autismo (EBPA-2010), realizado em Porto Alegre durante os dias 22-24 de abril de 2010. Tabela estimada a partir de levantamentos prévios baseado na estratificação da população brasileira.

Apesar de haver um padrão restrito para o diagnóstico, o TEA é altamente complexo e heterogêneo. O seu diagnóstico hoje é baseado em relatos familiares e escalas comportamentais e, como consequência, geralmente ocorre após dois ou três anos de idade, à medida que os prejuízos sociais gradualmente se tornam mais evidentes (Dover and Le Couteur 2007). Além disso, ainda não há marcador clínico ou exame que possa ser utilizado para antecipar o diagnóstico desse transtorno (Huerta and Lord 2012), e somado ao fato de que a alta prevalência acarreta elevado custo econômico e social, o TEA vem atraindo a atenção pública nos últimos anos.

1.3. Alterações neuroanatômicas envolvidas com a fisiopatologia do TEA

Diversas alterações na organização da citoarquitetura encefálica são observadas em pacientes com TEA, em regiões localizadas nos lobos frontal, parietal e temporal, cerebelo e estruturas límbicas subcorticais (Won, Mah, and Kim 2013). Sabe-se que indivíduos com condições patológicas do cerebelo, como hipoplasias, tumores e atrofas cerebelares, apresentam elevada incidência de TEA ou comportamentos do tipo autista (Parisi and Dobyns 2003). De fato, crianças com desordens cerebelares apresentam as mesmas alterações motoras observadas em crianças com TEA, tais como apraxia motora e problemas no tônus muscular (Tsai 2016). Além disso, alterações histológicas como mudanças na forma, no número e no volume das células de *Purkinje* cerebelares já foram descritas tanto em pacientes com TEA quanto em modelo animal (Ingram et al. 2000; Wegiel et al. 2010). O cerebelo, por meio de circuitos do tálamo e dos gânglios basais, regula as áreas pré-motora, pré-frontal e parietal do córtex cerebral, atuando sobre funções como linguagem, emoções e cognição (Buckner et al. 2011), sendo essa circuitaria alterada em pacientes com TEA (Crippa et al. 2016).

A amígdala é outra região bastante associada ao contexto do TEA. Em estudos com observações de pacientes com lesão na amígdala, esses indivíduos desenvolveram prejuízos no julgamento social (Baron-Cohen et al. 2000), além de também apresentarem dificuldade no reconhecimento de expressões de medo (Dickie and Armony 2008). Em pacientes com TEA também foi demonstrado menor conectividade funcional e alteração no volume e celularidade da amígdala (Guo et al. 2016). Já em modelos animais, estudos apontaram para diversas anormalidades, entre elas, alterações na atividade sináptica na amígdala basolateral (Hosie et al. 2018) e em células da glia (O'Loughlin et al. 2017).

O córtex cerebral é outra região frequentemente comprometida no TEA. Estudos com ressonância magnética relataram hiperplasia do córtex cerebral em crianças com TEA (Sparks et al. 2002). Em encéfalos *postmortem* foi encontrado 67% mais neurônios no córtex pré-frontal em crianças com TEA em relação às típicas (Courchesne et al. 2011). Alterações na organização neuronal nas

camadas corticais de neurônios e na citoarquitetura laminar, especialmente em córtex pré-frontal medial e córtex somestésico, já foram demonstradas no contexto do TEA (Casanova et al. 2002, 2006; Kataoka et al. 2013; Stoner et al. 2014). Anormalidades a nível de integração de regiões corticais podem ser um dos pontos chave no entendimento da fisiopatologia do TEA, uma vez que alterações tanto na densidade e morfologia neuronal, quanto na distribuição laminar e colunar podem afetar as conexões excitatórias inibitórias, bem como a circuitaria envolvida, influenciando todo o equilíbrio excitatório/inibitório (E/I), o qual também já se mostrou alterado (Fontes-Dutra et al. 2018; Snijders, Milivojevic, and Kemner 2013; Zikopoulos and Barbas 2013).

Muitos estudos vêm apontando uma redução no tamanho neuronal, acompanhada de aumento de densidade celular e redução da arborização dendrítica no hipocampo de pacientes com TEA, indicando uma alteração na maturação neuronal (Greco et al. 2011; Varghese et al. 2017). Ainda, espessamentos na região de CA1 do hipocampo são observadas, bem como anormalidades no giro denteado (Greco et al. 2011). Essa expansão da região de CA1 é caracterizada pelo aumento do número de neurônios piramidais, enquanto outras áreas adjacentes apresentam uma redução no número desses neurônios. Essas alterações celulares são acompanhadas por alterações em subtipos de populações de interneurônios GABAérgicos, observadas em um estudo *postmortem* do hipocampo anterior de pacientes (Lawrence et al. 2010). Nesse estudo, foi observado um aumento significativo de interneurônios positivos para calbindina no giro denteado, enquanto interneurônios positivos para parvalbumina apresentaram um aumento em sua densidade na região de CA1, acompanhado por um aumento na população de interneurônios positivos para calretinina, e CA3. Em um estudo clínico, um grupo de indivíduos com TEA apresentou displasias no córtex entorrinal e na região de CA1, enquanto anormalidades de migração e alteração na organização das camadas hipocâmpais foram observadas no giro denteado (Wegiel et al. 2010).

Embora os critérios diagnósticos do autismo estejam baseados em componentes comportamentais e cognitivos, alguns componentes, antes considerados secundários, atualmente possuem relevância no cenário global do transtorno. Um exemplo claro são as anormalidades sensoriais (como hipo ou

hiper-reatividade a estímulos sensoriais), observadas em 94% dos pacientes com TEA, sendo essas alterações no processamento sensorial componentes centrais de acordo com vários pesquisadores (Geschwind 2009). Sendo assim, a área somatossensorial é uma região de bastante interesse, uma vez que pesquisadores demonstraram a desorganização cortical nessa região em um modelo animal de autismo induzido pela exposição pré-natal ao VPA (Fontes-Dutra et al. 2018).

1.4. Aspectos etiológicos do TEA

Apesar dos avanços nas pesquisas sobre esse transtorno, a etiologia do TEA ainda permanece desconhecida. Porém acredita-se que exista uma interação entre fatores genéticos e ambientais.

A maioria das alterações genéticas conhecidas que contribuem para o risco de TEA afetam a expressão ou função de proteínas com papéis estabelecidos na formação, função e manutenção de sinapses ou no remodelamento da cromatina (De Rubeis and Buxbaum 2015). Em animais, a ablação dos genes associados a essas proteínas pode resultar em um fenótipo comportamental semelhante ao do TEA, como deficiências específicas na interação social, comunicação e comportamentos repetitivos (Varghese et al. 2017). Atualmente, existem pelo menos 86 genes fortemente associados ao TEA e 933 com evidências de menor nível de associação com o transtorno (Tammimies 2019). A escassez de estudos humanos *postmortem* ligando a neuropatologia à etiologia subjacente foi parcialmente abordada usando modelos animais para explorar o impacto de fatores genéticos e não-genéticos clinicamente relevantes para o fenótipo do TEA. Modelos geneticamente modificados incluem aqueles baseados em genes já bem estudados no TEA (NLGN3, NLGN4, NRXN1, CNTNAP2, SHANK3, MECP2, FMR1, TSC1/2, ADNP), genes de risco emergentes (CHD8, SCN2A, SYNGAP1, ARID1B, GRIN2B, DSCAM, TBR1), e variantes do número de cópias (deleção 15q11-q13, microdeleção 15q13.3, duplicação 15q11-13, deleção 16p11.2 e duplicação, deleção 22q11.2) (Tammimies 2019; Varghese et al. 2017). Dentre estas as mais conhecidas são:

- Gene MECP2: a proteína MeCP2 (do inglês *Methyl-CpG binding protein 2*), codificada pelo gene MECP2, é uma proteína nuclear que se liga preferencialmente ao DNA metilado em relação ao DNA não metilado, levando à repressão transcricional global por meio do recrutamento de co-repressores, como HDAC e fatores de silenciamento transcricional. As mutações de perda de função na MECP2 são a principal causa da Síndrome de Rett (RTT), um distúrbio do neurodesenvolvimento progressivo ligado ao cromossomo X que afeta quase exclusivamente pacientes do sexo feminino (Guang et al. 2018). Alguns miRNAs em ratos que possuem o gene MECP2 como alvo são o miR 132-5p e miR 218-5p.
- Gene SHANK3: o gene SHANK3 codifica as principais proteínas de ancoramento nas sinapses excitatórias, coordena o recrutamento de moléculas de sinalização e cria estruturas para o alinhamento apropriado dos receptores para neurotransmissores glutamatérgicos, o que promove o desenvolvimento e a maturação das sinapses excitatórias (Y. hui Jiang and Ehlers 2013; Naisbitt et al. 1999). Mutações de SHANK3 são responsáveis por cerca de 1% das formas idiopáticas do transtorno do TEA, e a interrupção do SHANK3 é uma das principais causas de déficits no neurodesenvolvimento na Síndrome de Phelan-McDermid (Aldinger et al. 2012; Betancur and Buxbaum 2013; Moessner et al. 2007) Pacientes com uma mutação do gene SHANK3 frequentemente exibem uma variedade de comorbidades, que incluem atraso global no desenvolvimento, distúrbios graves do sono, falta de fala ou atraso na linguagem, e características do transtorno do espectro autista (como deficiências sociais e estereotipias)(J. A. Chen et al. 2015; Leblond et al. 2014). Avanços recentes em edição gênica permitiram a criação de um modelo de mutação em SHANK3 em macacos-cinomolgos (*Macaca fascicularis*) (Y. Zhou et al. 2019). Alguns miRNAs em ratos que possuem o gene SHANK3 como alvo são o miR-504, miR 126a-5p e miR-374-5p.

Dentre os fatores ambientais de risco para o desenvolvimento de TEA, destaca-se o uso de medicamentos durante a gestação, como por exemplo o ácido valproico (VPA).

1.5 Modelo animal de autismo induzido pela exposição pré-natal ao ácido valproico (VPA)

O VPA é um fármaco amplamente utilizado como anticonvulsivante e estabilizador do humor (Diederich et al. 2010); porém, seu uso durante a gestação foi correlacionado com o desenvolvimento de TEA nos filhos das gestantes que utilizaram esse fármaco (Christianson, Chester, and Kromberg 1994; Moore et al. 2000; G. Williams et al. 2001; P. G. Williams and Hersh 1997). Com base nestas observações, foi estabelecido um modelo animal para o estudo do autismo induzido pela exposição pré-natal ao VPA (Bambini-Junior et al. 2011; T Schneider et al. 2008; Tomasz Schneider, Przewlocki, and Przewlocki 2005).

Filhotes machos expostos ao VPA durante o período embrionário apresentam várias características semelhantes às encontradas em pacientes com TEA, incluindo prejuízos comportamentais correspondentes aos observados em pacientes (Bambini-Junior et al. 2011; Fontes-Dutra et al. 2018; Hirsch et al. 2018; Rouillet et al. 2010; T Schneider et al. 2008; Tomasz Schneider, Przewlocki, and Przewlocki 2005), fato esse de extrema importância, visto que o diagnóstico de TEA é dado através da avaliação comportamental. Além disso, os roedores expostos ao VPA expressam também alterações moleculares semelhantes às observadas no TEA (Gottfried et al. 2013), incluindo níveis dos mesmos microRNA alterados em sangue (Hirsch et al. 2018).

Uma vez que atualmente os critérios para diagnóstico do TEA são exclusivamente clínicos e resultam de análises comportamentais, é pouco viável estudar esse transtorno em humanos antes da manifestação dos sintomas. Devido às suas peculiaridades, os modelos animais fornecem a oportunidade de análise de alterações do desenvolvimento que podem desencadear as características do TEA (Favre et al. 2013; Kataoka et al. 2013). Dessa forma, surge a possibilidade de estudo e manipulação de vias biológicas para

compreensão do surgimento das alterações morfológicas, funcionais e comportamentais encontradas no TEA.

Um estudo do nosso grupo mostrou que animais pré-natalmente expostos ao VPA apresentavam alterações no metabolismo do glutamato hipocampal idade-dependente, apresentando alterações na captação de glutamato, na atividade da enzima glutamina sintetase (GS) e na produção de glutathione (GSH), o principal antioxidante não-enzimático do sistema nervoso central (SNC) (Bristot Silvestrin et al. 2013). A relação do hipocampo com o aprendizado social, bem como sua participação no comportamento social é bem estabelecida (Rubin et al. 2014) e o estudo de moléculas-chave e rotas metabólicas e celulares envolvendo essa região são cruciais para a compreensão da fisiopatologia do TEA.

Ademais, alterações em vias de sinalização podem levar à expressão de certas características no encéfalo humano, incluindo macrocefalia, desregulação axonal, alteração no tamanho dos neurônios, conectividade de circuitos neuronais, proliferação de células cerebrais, síntese proteica e variação da densidade dendrítica em diferentes regiões encéfalo (J J Hutsler and Casanova 2016; Subramanian et al. 2015). Entre as diversas vias de sinalização existentes, o alvo mTOR (do inglês, *mammalian target of rapamycin*) desempenha um papel importante como um centro de sinalização que pode levar à regulação de certas características fisiopatológicas do autismo. Especificamente, no encéfalo, a via mTOR está envolvida na regulação da sinaptogênese, corticogênese e funções associadas dos neurônios (Gilbert and Man 2017). Estudos mostram que a via de Akt/mTOR regula a tradução proteica nos espinhos dendríticos, o que é um potencial substrato molecular do autismo. De fato, mutações em genes que codificam os componentes da via Akt-mTOR causam distúrbios com taxas mais altas de características autistas (Jeffrey J. Hutsler and Zhang 2010; Nicolini et al. 2015).

Além disso, estudos mostraram que a hiperacetilação transitória das histonas H3 e H4 no encéfalo de embriões de camundongos, induzida pela exposição pré-natal ao VPA, está associada a deficiências comportamentais pós-natais semelhantes ao autismo (Kataoka et al. 2013; Moldrich et al. 2013). Interessantemente, a exposição pré-natal a valpromida, um análogo de VPA sem

atividade inibidora de HDAC, não causa o aumento transitório nos níveis de histonas acetiladas em encéfalos de embriões de camundongos e não afeta o comportamento, ao contrário da exposição pré-natal ao ácido valproico (Kataoka et al. 2013). Esta evidência suporta a hipótese de que a inibição das HDAC durante uma janela crítica do desenvolvimento do SNC no embrião contribui para a patogênese do TEA (Nicolini and Fahnestock 2018).

Particularmente, o VPA poderia impactar o remodelamento axonal no desenvolvimento de neurônios indiretamente inibindo a proteína glicogênio sintase cinase 3 β (GSK3 β , do inglês, *glycogen synthase kinase*) (G. Chen et al. 1999; Hall et al. 2002) e, assim, promovendo a sinalização Wnt (do inglês, *Wingless-related integration site*) (Hall et al. 2002).

A via da Wnt pode ser dividida em via canônica e não-canônica (Kalkman 2012). A via canônica é responsável pela translocação da β -catenina para o núcleo celular, ativando a transcrição gênica de genes envolvidos com a proliferação, diferenciação e migração celular, principalmente durante o neurodesenvolvimento. Por outro lado, a via não-canônica da Wnt (ou via da polaridade planar celular Wnt/PCP, do inglês *planar cell polarity*) é responsável pela ativação da cinase c-Jun N-terminal, RhoA e Rac1, levando a mudanças na dinâmica organizacional do citoesqueleto associado à actina e aos microtúbulos (Kalkman 2012).

A via de sinalização Wnt regula a diferenciação de progenitores intermediários corticais em neurônios (Munji et al. 2011) e a padronização do córtex cerebral (Chenn 2008). O VPA também pode afetar a diferenciação e a proliferação de progenitores de células neurais através da via β -catenina-Ras-ERK-p21 (Jung et al., 2008). Especificamente, o VPA promove a ativação da β -catenina, um mediador chave da sinalização Wnt (MacDonald, Tamai, and He 2009), inibindo indiretamente a GSK3 β (Jung et al. 2008). A β -catenina ativada regula a Ras, que por sua vez aumenta os níveis de ERK fosforilada (Jung et al. 2008). A subsequente indução mediada por ERK de p21 modula a estimulação da diferenciação de progenitores de células neuronais e a inibição da sua proliferação (Jung et al. 2008). Embora a importância da inibição da atividade desacetilase de histonas apresentada pelo VPA para o desenvolvimento de

comportamentos do tipo autista em modelos animais já tenha sido demonstrada, o envolvimento desses outros possíveis mecanismos de ação do VPA em comportamentos precisa ainda ser demonstrado.

1.6 microRNA

Os microRNA (miRNA) são pequenos RNA não-codificantes com 19-25 nucleotídeos que atuam como reguladores da tradução de RNA mensageiros (RNAm) em suas correspondentes proteínas. Assim, eles se destacam como elementos essenciais no controle de diversos processos celulares durante o desenvolvimento e na fase adulta (Ambros 2004). Desde sua primeira descrição em 1993 (Lee, Feinbaum, and Ambros 1993), muitos estudos têm mostrado que essas moléculas são capazes de controlar seus RNA mensageiros alvos através da interação principalmente com suas regiões 3'UTR (Bartel 2009; Filipowicz, Bhattacharyya, and Sonenberg 2008).

Quanto à biogênese, os miRNA são gerados a partir de regiões específicas de diversos genes, os quais são transcritos em um miRNA primário longo (pri-miRNA) pela enzima RNA polimerase III (Borchert, Lanier, and Davidson 2006). Depois de transcrito, o pri-miRNA é clivado no núcleo por um complexo formado pelas proteínas Dgcr8 e Drosha a uma estrutura mais curta em forma de grampo, com 50-120 nucleotídeos, a qual constitui o miRNA precursor (pré-miRNA) (W. Yang et al. 2006). O pré-miRNA é então transportado para o citoplasma pela proteína exportina 5 (Yi et al. 2005). Uma vez no citoplasma, o pré-miRNA sofre a ação da enzima Dicer, uma RNAase III, produzindo então uma fita dupla (miRNA: miRNA*) de aproximadamente 22 pares de bases. Após a separação desse duplex, uma das fitas (miRNA*) será degradada e outra (miRNA) será acoplada ao complexo RISC (do inglês, *RNA-induced silencing complex*) (Okamura et al. 2008). O complexo RISC, por sua vez, liga-se em sequências localizadas predominantemente na região 3'UTR do RNAm, podendo bloquear a sua tradução e/ou conduzi-lo à degradação (Doench and Sharp 2004; Kedde et al. 2007; Liu 2008). Além de regular o processo de tradução, sabe-se que os miRNA podem influenciar a transcrição gênica, uma vez que interferem nos níveis de fatores de transcrição (Kosik 2006). Esse processo pode ser visualizado na Figura 1.

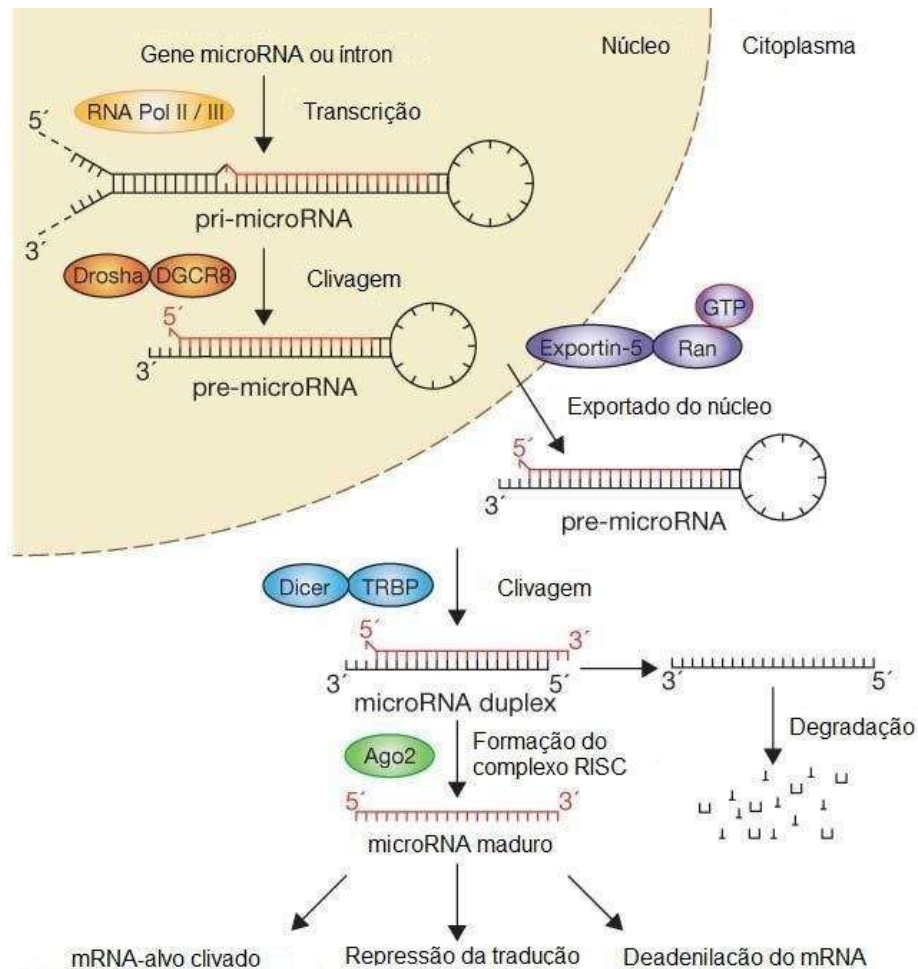


Figura 1. Biogênese de microRNA. Adaptado de Winter *et al.*, 2009 (Winter et al. 2009).

Para que haja um reconhecimento específico do RNAm alvo pelo seu miRNA, não é necessária a complementaridade total de bases entre essas duas sequências. Em vez disso, uma pequena sequência de 6–8 nucleotídeos na extremidade 5' do miRNA, conhecida como sequência “seed”, proporciona grande parte da regulação gênica via miRNA (Grimson et al. 2007). De fato, complementaridades parciais entre sequências de miRNA e as regiões terminais 3' UTR dos RNAm alvos são suficientes para impedir sua tradução ou proporcionar sua desestabilização. Pelo fato da exigência desse pequeno número de bases para essa regulação, um grande número de transcritos pode ser alvo de um único miRNA. Por outro lado, um único RNAm pode ser negativamente regulado por diversos miRNA (Friedman et al. 2008).

Os miRNA estão possivelmente envolvidos em todos os processos biológicos, como modificar e modular a tradução de milhares de RNAm (Kamal, Mushtaq, and Greig 2015). Assim, podem participar na regulação de vários processos celulares fisiológicos e patológicos, incluindo o desenvolvimento do embrião, proliferação, migração e diferenciação celular, apoptose, sobrevivência, tumorigênese e plasticidade sináptica (Broderick and Zamore 2011). Diversas interações entre miRNA e seus alvos já foram validadas experimentalmente em diferentes espécies e diversas interações entre rotas de sinalização já foram descritas (Hsu et al. 2011). Dessa forma, há uma crescente evidência que os miRNA possuem funções centrais nessas rotas através da regulação da tradução de seus componentes proteicos. Em contrapartida, foi demonstrado que algumas dessas rotas de sinalização podem, por si só, modular a expressão de diversos miRNA (Davis-Dusenbery and Hata 2010), resultando em uma dependência funcional bidirecional entre miRNA e rotas de sinalização. Os miRNA são particularmente abundantes no SNC, sendo que algumas populações se encontram enriquecidas em regiões encefálicas específicas (Cao et al. 2006; Saugstad 2010). Eles estão envolvidos no desenvolvimento do sistema nervoso, na manutenção do fenótipo neuronal, bem como na diferenciação celular. Exemplos de miRNA com essas funções são miR-430, miR-9 e miR-124 (Barbato et al. 2008). Além disso, esses pequenos reguladores também são expressos em dendritos, como o miR-134, que regula negativamente o tamanho de espinhos dendríticos e sua ação é bloqueada pelo BDNF (do inglês, *brain-derived neurotrophic factor*) (Schratt et al. 2006) e o miR-138, que tem papel na maturação dessas estruturas (Siegel et al. 2009). Alguns miRNA, como o miR-132 e o miR-124, influenciam a síntese local de proteínas, implicados, assim, na plasticidade sináptica (Barbato et al. 2008; Saugstad 2010; Wayman et al. 2008).

Níveis alterados de alguns miRNA têm sido descritos em várias desordens do SNC, como doença de Alzheimer, doença de Parkinson, doença de Huntington, atrofia lateral amiotrófica, esquizofrenia e outras (Saugstad 2010; De Smaele, Ferretti, and Gulino 2010). Em um estudo, 470 miRNA humanos foram avaliados em seis pacientes com TEA e seis indivíduos neurotípicos e verificou-se que 9 dos 470 miRNA apresentavam níveis aumentados ou diminuídos nos

pacientes autistas, sugerindo o envolvimento dos miRNA na fisiopatologia do TEA (Talebizadeh, Butler, and Theodoro 2008). Outros estudos também sugerem alterações na regulação de vários miRNA associados ao TEA, dentre eles miR-132, miR-146a, miR-23a, miR-23b (Talebizadeh, Butler, and Theodoro 2008), miR-106b e miR-23a (Abu-Elneel et al. 2008) (Tabela 2).

Tabela 2. Lista de microRNA com expressão alterada em indivíduos com TEA

microRNA	Expressão	Amostra Biológica	Referência
miR-132, miR-146a, miR-146b, miR-23a, miR-23b, miR-663	Aumentada	Linfócitos	(Talebizadeh, Butler, and Theodoro 2008)
miR-92 (a1-a2), miR-320, miR-363	Reduzida	Linfócitos	(Talebizadeh, Butler, and Theodoro 2008)
miR-185, miR-103, miR-107, miR-29b, miR-194, miR-524, miR-191, miR-376a-AS, miR-451, miR-23b, miR195, miR-342, miR-23a, miR-186, miR-25, miR-519c, miR-346, miR-205, miR-30c, miR-93, miR-186, miR-106b	Aumentada	Linfócitos	(Sarachana et al. 2010)
miR-182-AS, miR-136, miR-518a, miR-153-1, miR-520b, miR-455, miR-326, miR-199b, miR-211, miR-132, miR-495, miR-16-2, miR-190, miR-219, miR-148b, miR-189, miR-133b, miR-106b, miR-367, miR-139	Reduzida	Linfócitos	(Sarachana et al. 2010)
miR-101-3p, miR-106b-5p, miR-130a-3p, miR-195-5p, miR-19b-3p	Aumentada	Soro	(Mundalil Vasu et al. 2014)
miR-151a-3p, miR-181b-5p, miR-320a, miR-328, miR-433, miR-489, miR-572, miR-663a	Reduzida	Soro	(Mundalil Vasu et al. 2014)
miR-484, miR-21, miR-212, miR-23a, miR-598, miR-95, miR-129, miR-43, miR-7, miR-15a, miR-27a, miR-15b, miR-148b, miR-132, miR-128, miR-93	Aumentada	Cerebelo	(Abu-Elneel et al. 2008)
miR-93, miR-106a, miR-539, miR-652, miR-550, miR-432, miR-193b, miR-181d, miR-146b, miR-140, miR-381, miR-320a, miR-106b	Reduzida	Cerebelo	(Abu-Elneel et al. 2008)
miR-142-5p, miR-142-3p, miR-451a, miR-144-3p	Aumentada	Córtex pré-frontal	(Mor et al. 2015)
miR-34b	Reduzida	Sangue	(F. Huang et al. 2015)
miR-let-7a, miR-let-7d, miR-103a, miR-1228	Aumentada	Sangue	(F. Huang et al. 2015)

miR-628-5p, miR-127-3p, miR-335-3p, miR-2467-5p, miR-28-5p, miR-191-5p, miR-3529-5p, miR-218-5p, miR-7-5p, miR-140-3p	Aumentada	Saliva	(Hicks et al. 2016)
miR-27a-3p, miR-30e-5p, miR-23-3p, miR-32-5p	Reduzida	Saliva	(Hicks et al. 2016)
miR-365a-3p, miR-619-5p, miR-664a-3p	Aumentada	Soro	(Kichukova et al. 2017)
miR-3135a, miR-328-3p, miR-197-5p, miR-500a-5p, miR-424-5p	Reduzida	Soro	(Kichukova et al. 2017)
miR134-5p, miR138-5p	Aumentada	Sangue	(Hirsch et al. 2018)

Fonte: adaptado de Marchezam, 2018 (Marchezam 2018).

No entanto, poucos estudos têm demonstrando o papel dos miRNA no contexto de TEA, tornando-se uma abordagem importante em modelos animais para desvendar novos alvos biológicos e ampliar a compreensão da fisiopatologia do TEA.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar níveis de um conjunto de microRNA no modelo animal de autismo induzido por exposição pré-natal ao ácido valproico, bem como investigar os papéis desses pequenos RNA em diferentes processos biológicos por análises *in silico*.

2.2. Objetivos Específicos

- Avaliar em estruturas encefálicas (área somatossensorial, amígdala, córtex pré-frontal medial, cerebelo e hipocampo) de ratos de 42 dias do modelo animal de autismo, a expressão relativa de um conjunto de miRNA;
- Relacionar a regulação de genes alvos de miRNA com rotas de sinalização e/ou processos biológicos, a nível de bioinformática, que possam estar relacionados com a patogênese do autismo e surgimento de fenótipos associados a esse transtorno.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Animais

O presente trabalho utilizou amostras biológicas do projeto #23884 realizado com ratos *Wistar* do biotério do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (anexo I). Todos os animais receberam ração e água *ad libitum*. Foram colocados no máximo 4 animais por caixa (machos ficaram separados das fêmeas) e foram mantidos em ambiente climatizado ($22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$), com ciclo claro/escuro de 12 horas, bem como em condições padrão de umidade. O pareamento de machos e fêmeas ocorreu às 19 horas e na manhã seguinte, os animais foram separados e a fecundação foi verificada através da presença de espermatozoides no canal vaginal das ratas. Quando confirmada a fecundação das fêmeas, esse foi considerado o dia embrionário 0 (E0). As fêmeas prenhes foram mantidas em duplas até o 18º dia de gestação, seguido por alojamento em gaiolas individuais até o nascimento da prole.

3.2. Modelo animal de autismo

O modelo animal de autismo utilizado neste trabalho consiste na injeção intraperitoneal de 600 mg/Kg de VPA diluído em NaCl 0,9% no dia 12,5 de gestação, como previamente descrito (Bambini-Junior et al. 2014). Às fêmeas do grupo controle, somente a salina foi aplicada neste dia. Assim, formam-se os dois grupos experimentais conforme representado na Figura 2:

- Controle: recebeu salina no dia E12,5;
- VPA: recebeu VPA no dia E12,5.

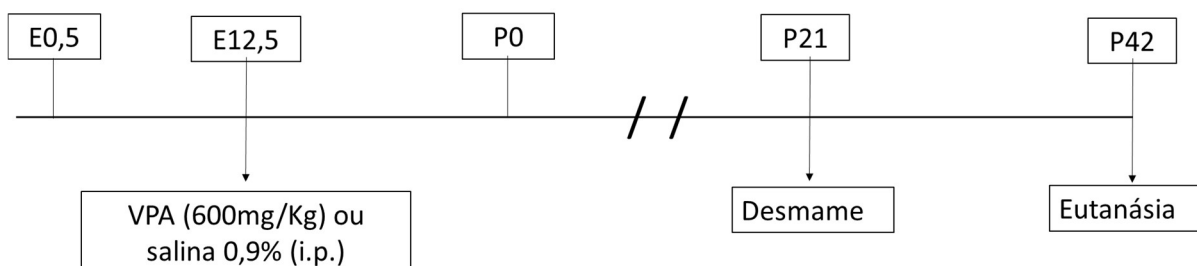


Figura 2. Representação do desenho experimental.

3.3. Coleta de tecidos, extração de RNA e RT-qPCR

Para estas análises, foram utilizados tecidos coletados nos últimos dois anos. Brevemente, no dia pós-natal 42 (P42), os animais foram eutanasiados por sobredose anestésica com cetamina (300 mg/Kg) e xilasina (40 mg/Kg), decapitados e as estruturas encefálicas (área somatossensorial, amígdala, córtex pré-frontal medial, cerebelo e hipocampo) foram isoladas e homogeneizadas em reagente *Trizol*® (Invitrogen, EUA).

Após a homogeneização das amostras, foi adicionado clorofórmio para realizar a separação de fases e o RNA foi precipitado a partir da camada aquosa superior usando isopropanol. O RNA precipitado foi lavado com etanol para remover impurezas, ressuspensão em água livre de RNase.

A síntese de DNA complementar (cDNA) foi realizada de acordo com Chen e colegas (C. Chen et al. 2005). Foi adicionado 1,25 mM dos 18 *primers stem-loop* e água livre de RNase para um volume total de 17 mL seguido de uma incubação a 65°C por 5 minutos e resfriamento em gelo. A enzima MML-V RT (New England Biolabs, MA, USA) foi usada para a síntese de cDNA de acordo com as instruções do fabricante. Cada *mix* de reação foi incubado a 16°C por 30 minutos seguido de outros 30 minutos a 42°C. Todas as amostras de cDNA foram diluídas 50 vezes em água livre de RNase. Os *primers stem-loop*, *primers* de iniciação e o *primer* universal reverso foram desenhados de acordo com Chen e colegas (C. Chen et al. 2005).

A transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase em tempo real quantitativa (RT-qPCR) foi realizada no sistema de detecção de PCR em tempo real Bio-Rad CFX384 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) usando SYBR Green I (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). O PCR foi realizado no volume de 10 µL contendo 5 µL de cDNA diluído (1:50), 1× SYBR Green I (Invitrogen, CA, USA), 0.1mM de dNTPs, 1× Tampão de PCR, 3mM MgCl₂, 0.25U de Taq DNA Polimerase (Quatro G, RS, Porto Alegre, Brazil) e 200 nM de cada *primer* de iniciação e reverso. Amostras foram analisadas em triplicatas biológicas em placa de 384 poços, e, um controle foi incluído. Os genes de referência foram escolhidos de acordo com o *software* geNorm® para determinar o número de miRNA necessários para normalização e para identificar os miRNA mais estáveis. As configurações da PCR foram configuradas como segue: uma etapa

inicial de ativação da polimerase por 5 min a 95 °C, 40 ciclos de 15 segundos a 95 °C para desnaturação, 10 segundos a 60 °C para anelamento e 10 segundos a 72 °C para alongamento. A análise da curva de *melting* foi programada ao fim da corrida de PCR no intervalo de 65 a 95 °C, e a temperatura aumentou gradualmente em 0,4 °C. O limite e as linhas de base foram determinados manualmente usando o software do gerenciador Bio-Rad CFX. Para calcular a expressão relativa dos miRNA foi utilizado o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak and Schmittgen 2001). O teste *t* de Student foi realizado para comparar as diferenças de expressão entre as diferentes amostras. As médias foram consideradas significativamente diferentes quando $p < 0,05$.

3.4. Primers

Os seguintes *primers* foram utilizados na técnica de RT-qPCR: miR-25-3p, miRLoop-25-3p, miR-23a-3p, miRLoop-23a-3p, miR-199a-5p, miRLoop-199a-5p, miR-181b-5p, miRLoop-181b-5p, miR-218-5p, miRLoop-218-5p, miR-195-5p, miRLoop-195-5p, miR-145-3p, miRLoop-145-5p, miR-134-5p, miRLoop-134-5p, miR-30-5p, miRLoop-30-5p, miR-191-5p, miRLoop-191-5p, miR-132-3p, miRLoop-132-3p, miR-181a-5p, miRLoop-181a-5p, miR-124-3p, miRLoop-124-3p, miR-125a-5p, miRLoop-125a-5p, miR-146a-5p, miRLoop-146a-5p, miR-21-5p, miRLoop-21-5p, miR-106b-5p, miRLoop-106b-5p, miR-138-5p, miRLoop-138-5p, miR universal reverso. As sequências estão descritas na Tabela 3.

Tabela 3. Lista de sequências dos *primers forward* (F), *stem loop* (SL) e *primer* universal reverso usados para análise RT-qPCR.

miRNA		Sequência
miR 132-3p	F	TCCGGCTAACAGTCTACAGCCA
	SL	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGACCGACCA
miR 138-5p	F	TCCGGAAGCTGGTGTGTGAATC
	SL	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGACCGGCCT
miR 125a-5p	F	GTCGCGATCCCTGAGACCCTTTA
	SL	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGACTCACAG
miR 195-5p	F	GGGCGCTAGCAGCACAGAAATA
	SL	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGACGCCAAT
miR 106b-5p	F	GGGCGCTAAAGTGCTGACAGT
	SL	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGACATCTGC
miR 199a-5p	F	GATGCGCCCAGTGTTCACT
	SL	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGACGAACAG

miR 134-5p	F	GGCTCTTGACTGGTTGACCA
	SL	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGACCCCCTC
miR 124-3p	F	CTAGCTTAAGGCACGCGGTGA
	SL	CGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGACGGCATT
miR 181a-5p	F	GCGCTGAACATTCAACGCTGTC
	SL	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGACACTCAC
miR 181b-5p	F	GCTGCGCAACATTCAATTGCTGTC
	SL	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGACACCCAC
miR 25-3p	F	TCAGCACATTGCACTTGTCTCGG
	SL	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGACTCAGAC
miR 23a-3p	F	GCTGTCACTCACATTGCCAGGGA
	SL	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGACGGAAAT
miR 21-5p	F	CCGGCGCTAGCTTATCAGACTGAT
	SL	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGACTCAACA
miR 146a-5p	F	CGTGCGTGAGAACTGAATTCCA
	SL	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGACAACCCA
miR 218a-5p	F	GCCGTCCTTGCTTGATCTAACC
	SL	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGACACATGG
miR 30c-5p	F	GCGTCGCTGTAAACATCCTACACTC
	SL	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGACGCTGAG
miR 191-5p	F	GGAGCGTCAACGGAATCCCAAAAG
	SL	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACG
miR 145-5p	F	TTGGAGGTCCAGTTTCCCAGGA
	SL	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGACAGGAT
Universal Reverso		CCAGTGCAGGGTCCGAGGTA

5. DISCUSSÃO

Sabe-se que o TEA é uma desordem complexa e heterogênea, envolvendo alterações em diversas moléculas teciduais e circulantes. Trabalhos anteriores do grupo mostraram que há alterações de miRNA tanto no sangue de animais do modelo de autismo induzido pela exposição pré-natal ao VPA quanto no sangue de pacientes com TEA. Dessa forma, como o miRNA pode passar para a corrente sanguínea a partir de células ou tecidos, é razoável supor que as alterações nos níveis de miRNA no sangue, como as que já foram observadas no modelo VPA (Hirsch et al. 2018), possam refletir possíveis alterações nos tecidos neurais. Assim, no presente trabalho, a proposta foi avaliar um conjunto de 18 miRNA envolvidos com a neuroplasticidade, em diferentes regiões encefálicas relevantes para o TEA, sendo elas: área somatossensorial, córtex pré-frontal medial, cerebelo, hipocampo e região da amígdala.

No presente trabalho, foi observada uma redução significativa no miR195, ao passo que miR30c e miR-181 se mostraram aumentados no grupo VPA. Sabe-se que o miR195 apresenta como alvos os genes WNT3A e WNT7A, ambos envolvidos com a ativação da via canônica da Wnt e pertencentes à família Wnt1 de ativadores dessa via (He et al. 2015; X. Huang et al. 2018). Uma vez que animais expostos pré-natalmente ao VPA apresentam uma redução da metilação dos genes da família Wnt1/2 (Z. Wang et al. 2010) (que constituem uma grande família de moléculas envolvidas em sinalização intercelular ao longo do desenvolvimento), o presente trabalho aponta para um mecanismo promissor de hiperativação da via da Wnt no modelo VPA, a partir da redução dos níveis de microRNA regulatório de ativadores Wnt1, como o miR195-5p, o qual leva a um aumento na presença de genes da família Wnt1, como WNT3A e WNT7A.

Ao longo dos anos, diversas evidências vêm apontando a via de sinalização da Wnt (ou apenas via da Wnt) como um alvo de estudo promissor para a compreensão da fisiopatologia de transtornos psiquiátricos e do neurodesenvolvimento, como a esquizofrenia, o transtorno de humor bipolar e o TEA (Mulligan and Cheyette 2016). A contribuição das vias de sinalização da β -catenina/Wnt nos estágios iniciais do desenvolvimento neural é crucial para que os neurônios se diferenciem e realizem uma migração adequada para regiões

corticais (Kalkman 2012). Além disso, essa via vem sendo apontada como um dos principais alvos de investigação etiológica e fisiopatológica no TEA (Kalkman 2012).

Estudos com pacientes diagnosticados com TEA mostram aumento da sinalização da via da Wnt/ β -catenina (Zhang et al. 2012b), bem como uma redução da metilação de genes Wnt1/2 (Martin et al. 2013; Wassink et al. 2013), os quais são apontados como genes de suscetibilidade para o TEA. Diversos outros componentes dessa via estão alterados no TEA, como os genes WNT3 (Gilman et al. 2011), WNT7A (T.N. et al. 2016), APC (Barber et al. 1994; X. L. Zhou et al. 2007), CTNNB1 (B.J. et al. 2012; Krumm et al. 2014), TCF4 (Lotan et al. 2014) e TCF7 (Iossifov et al. 2014). De forma similar, alterações em elementos da via da Wnt/PCP também são descritos dentro do TEA, como mutações nos genes PRICKLE1 e PRICKLE2 (regulam a via de sinalização Wnt não canônica que estabelece polaridade celular planar), associados previamente com epilepsia (Bosoi et al. 2011; Tao et al. 2011), uma comorbidade prevalente em cerca de 30% dos pacientes diagnosticados com TEA (Buckley and Holmes 2016). Ambos genes são responsáveis pela produção de proteínas com papéis na sinaptogênese: PRICKLE1 apresenta um papel importante para a produção de Syn1 (sinapsina, do inglês, *synapsin*) na porção pré-sináptica (Paemka et al. 2013), enquanto que PRICKLE2 interage com PSD-95 e o receptor ionotrópico glutamatérgico NMDA, na porção pós-sináptica (Hida et al. 2011).

Estudos utilizando modelos animais demonstram que a hiperativação da via da Wnt é capaz de levar a alterações no neurodesenvolvimento que são similares às encontradas no TEA. A exposição de camundongos prenhes ao composto XAV939, o qual leva a alterações na via canônica da Wnt, leva à proliferação celular no córtex em desenvolvimento, devido ao aumento da população de células progenitoras, prejudicando a organização cortical típica e a proporção de neurônios excitatórios e inibitórios (Fang et al. 2014). Na literatura, já foi demonstrado que o modelo animal por exposição pré-natal ao VPA possui como alvo a modulação da GSK3 (Go et al. 2012; Phiel et al. 2001; L. Wang et al. 2015; Wiltse 2005; Zhang et al. 2012b)..

Por outro lado, os microRNA miR30c e miR181 apresentam como alvo o gene GSKIP, um importante inibidor da GSK3 (Chou et al. 2018). A interação da

GSKIP com a GSK3 β é necessária para a regulação da sinalização da via da Wnt por meio de um complexo de destruição citoplasmática visando a β -catenina para degradação, levando, assim, à regulação negativa da sinalização da via da Wnt (Dema et al. 2016; Hundsrucker et al. 2010). Além disso, uma das vias não-canônicas da Wnt/ β -Catenina envolve a ativação de diversas proteínas envolvidas com o remodelamento do citoesqueleto; já se observou que diversos genes participantes dessa via, como PRICKLE1 (um dos alvos do miR30) estão alterados em indivíduos com TEA (Sans et al. 2016). Interessantemente, alterações nesses genes estão envolvidas com prejuízos no fechamento do tubo neural (Sowers et al. 2013), uma importante característica da exposição pré-natal ao ácido valproico no primeiro trimestre gestacional. Em conjunto, tanto a redução do miR195, quanto o aumento dos miR30c e miR181 podem contribuir para o aumento da ativação da via da Wnt, a partir da regulação de pontos específicos, como os ativadores WNT3A e WNT7A e o inibidor GSKIP (Figura 7B).

Dados da literatura mostram que o miR132-3p está enriquecido em tecidos cerebrais de camundongos e humanos e desempenha um papel na neurogênese e na diferenciação neuronal (De Smaele, Ferretti, and Gulino 2010; Song and Tuan 2006). Além disso, o miR132-3p é expresso em espinhos dendríticos e está envolvido na plasticidade sináptica (Tognini and Pizzorusso 2012), processos que estão alterados no TEA. Assim, acredita-se que um aumento do miR132-3p poderia implicar em comprometimentos dessas funções as quais potencialmente podem ser encontradas no nosso modelo animal. Um alvo validado para miR132-3p em humanos e ratos é o MECP2 (orienta a atividade gênica e é importante para o funcionamento do sistema nervoso central), o qual é regulado negativamente quando os níveis desse miRNA estão aumentados, demonstrado tanto em cultura de neurônios (Lyu et al. 2016) quanto em experimentos *in vivo* (Hansen et al. 2010). Interessantemente, um dos mecanismos da estabilização da proteína MeCP2 é dado pela via da Wnt/ β -Catenina (Kweon et al. 2016; Lyu et al. 2016), possibilitando um possível ponto de regulação do miR-132-5p, em que o aumento desse microRNA pode estar relacionado com a redução dos níveis dessa proteína. Ademais, a avaliação *postmortem* de encéfalos de pacientes com TEA mostra que os níveis de

proteína MeCP2 estão diminuídos no córtex (Nagarajan et al. 2006; Smeets, Pelc, and Dan 2012). De forma similar, uma redução nos níveis proteicos de MecP2 é observado em animais expostos ao VPA (K. C. Kim et al. 2016). Somado aos dados obtidos nesse trabalho, é possível que essa redução nos níveis proteicos de MeCP2 possa estar relacionado com o aumento do miR-132-5p, destacando o envolvimento desse microRNA na fisiopatologia da TEA.

De uma forma geral, a modulação a partir dos microRNA estudados nesse trabalho parece modular a via da Wnt por meio de um aumento da atividade de sua via canônica e redução da atividade das suas vias não-canônicas, no grupo VPA (Figura 7B). Estudos realizando nocautes para reguladores da via da Wnt, como para o gene *Dishevelled-1* ($Dvl1^{-/-}$) exibem alterações no comportamento social, enquanto que nocautes para $Dvl1^{-/-}Dvl3^{+/-}$ apresentam alterações nos comportamentos repetitivos (Noelanders and Vleminckx 2017). Além desses dados, esses animais nocaute para $Dvl1^{-/-}Dvl3^{+/-}$ também apresentaram um aumento transiente no tamanho encefálico e uma redução de neurônios das camadas profundas positivos para Brn2, indicando diferenciação prematura. Sabe-se que o controle da modulação da sinalização da via da Wnt/ β -catenina durante o neurodesenvolvimento é necessária para o estabelecimento de comportamento social e estereotipado em ratos adultos (Zhang et al. 2012a). Na vida pós-natal, vários estudos com ratos pré-natalmente exposto ao VPA mostram um aumento da atividade da via canônica da Wnt/ β -catenina (Zhang et al. 2012b) e estratégias terapêuticas, como a administração do Sulindaco (um inibidor dessa via canônica da Wnt/ β -catenina), reestabeleceu as alterações comportamentais induzidas pela exposição ao VPA e normalizou os níveis de p-Gsk3 β e β -catenina no córtex pré-frontal, hipocampo e cerebelo (Qin and Dai 2015). A partir desses dados, é possível que existam diferentes janelas de regulação da via canônica da Wnt/ β -catenina, havendo uma transição entre o período embrionário e o período pós-natal nos seus níveis de atividade. No período pré-natal, é possível que a exposição pré-natal ao VPA possa estar modulando de forma similar ao que é observado em nocautes para Dvl, uma vez que existem similaridades nos achados entre os dois modelos, tanto a nível comportamental, quanto a níveis moleculares. Na vida pós-natal, os níveis elevados de atividade da via da Wnt/ β -catenina podem estar relacionadas com

um mecanismo compensatório de regulação dessa via, a partir da elevação dos miRNA observados, devido a essa exposição pré-natal ao VPA. Mais estudos são necessários para compreender o envolvimento dessa via durante o neurodesenvolvimento embrionário nos ratos pré-natalmente expostos ao VPA, bem como a modulação desses miRNA propostos nesse contexto.

Considerando a via não-canônica da Wnt, variantes de PRICKLE2 (p.E8Q e p.V153I) são observadas em pacientes com TEA (Sowers et al. 2013). Camundongos deficientes para proteína Prickle2 apresentam fenótipos do tipo autista, como alterações na interação social, rigidez comportamental e redução do limiar convulsivo (Sowers et al. 2013). A proteína Prickle2 interage com a proteína da densidade pós-sináptica 95 (PSD-95) e redução da arborização dendrítica, número de sinapses, tamanho da densidade pós-sináptica são observados em neurônios hipocámpais de camundongos deficientes para Prickle2 (Sowers et al. 2013). Uma vez que PRICKLE2 está envolvida com a via não-canônica da Wnt, esses fenótipos associados com o TEA levantam a possibilidade do envolvimento da via não-canônica, como discutido anteriormente. Ambas as vias canônica e não canônica da Wnt são importantes para estabelecer circuitos neurais, os quais estão comprometidos no TEA. Dessa forma, é possível que as alterações observadas nos miRNA envolvidos na via não-canônica (Figura 7B) possam estar relacionadas com a redução da ativação dessa via, a qual é paralelamente observada em alterações pós-natais de modelos nocaute para Prickle2 (Kwan, Unda, and Singh 2016).

Outro importante alvo validado para o miR132-3p é a metaloproteinase 9 de matriz (MMP9). A MMP9 é importante na sinaptogênese, na localização dos percursos axonais, está envolvida na degradação da matriz extracelular e na plasticidade cortical (Reinhard, Razak, and Ethell 2015; Vafadari, Salamian, and Kaczmarek 2016). Níveis alterados de MMP9 já foram quantificados em amostras de líquido amniótico de casos de TEA (Abdallah et al. 2012, 2013). MMP9 também regula os níveis da neuroligina-1 sináptica (Peixoto et al. 2012), um gene que tem sido associado a casos de TEA (Glessner et al. 2009; O'Roak et al. 2012). Além disso, em um modelo de camundongo deficiente em COX-2, a expressão de MMP9 foi encontrada diminuída, e essa alteração dos níveis de MMP9 durante a infância afetaria os processos de desenvolvimento, o que pode contribuir para comportamentos semelhantes ao autismo observados neste

estudo (Wong, Bestard-Lorigados, and Crawford 2019). Em uma análise de bioinformática através de um depósito de um banco de RNA-Seq do CPFm de animais do modelo VPA por Qian e colaboradores (Qian et al. 2018), o gene alvo para MMP9 também se encontra diminuído. Esse gene também apresenta um papel importante na via da Wnt, uma vez que MMP-9 é um efetor molecular chave da ativação da Wnt (Ingraham et al. 2011).

Além de MECP2 e da MMP9, a PTEN também é um dos alvos do miR132-3p. Sabe-se que a proteína PTEN, a qual exerce um papel regulatório na via PI3K-Akt-mTOR (Figura 7C), está associada a prejuízos nos comportamentos de interação social em animais PTEN^{+/-} (Kwon et al. 2006). Em camundongos pré-natalmente expostos ao VPA, a expressão proteica do PTEN se mostrou diminuída no córtex cerebral e no hipocampo (E.-J. Yang et al. 2016), dados que estão de acordo com o aumento do miR132 encontrado no CPFm do nosso modelo VPA. Sabe-se que a Akt está hiperativa no contexto do TEA e a hiperativação do mTORC1 está relacionada com diferentes desfechos observados em indivíduos com autismo, como, por exemplo, alterações sinápticas no aumento de espinhos dendríticos em diferentes regiões encefálicas (Winden, Ebrahimi-Fakhari, and Sahin 2018). Ademais, o complexo de degradação da β -Catenina interage com os dois complexos de supressão tumoral (TSC1 e TSC2) da rota da mTOR, a qual é estudada como um dos mecanismos moleculares para a fisiopatologia do TEA (Caracci, Ávila, and De Ferrari 2016). A modulação do TSC1/2 com esse complexo da β -Catenina modula diretamente a sinalização da Wnt (Mak et al. 2003, 2005). Além disso, já se mostrou que camundongos nocautes para PTEN apresentam uma atividade elétrica basal dos neurônios alterada em favor do aumento da corrente pós-sináptica excitatória (Haws et al. 2014; Luikart et al. 2011). Esses achados demonstram um equilíbrio alterado da atividade excitatória e inibitória, o que também é encontrado em pacientes com TEA (Tilot, Frazier, and Eng 2015). Nosso grupo também já demonstrou que há uma alteração no metabolismo do glutamato, principal neurotransmissor excitatório, em astrócitos dos animais do grupo VPA, com maior captação de glutamato, menor atividade de glutamina sintetase e aumento de glutatona (Bristot Silvestrin et al. 2013).

Por fim, as semaforinas (SEMA) são proteínas sinalizadoras extracelulares essenciais para o desenvolvimento e manutenção de muitos órgãos e tecidos envolvidos em processos cruciais durante o neurodesenvolvimento, como a migração neuronal, direcionamento axonal e sistema imune. A família das SEMA é composta por mais de 20 membros (Alto and Terman 2017), dentre eles a SEMA3G, alvo do miR146. Como no modelo VPA esse miRNA se encontra aumentado, a expressão de SEMA3G deve se encontrar diminuída, o que corrobora o resultado encontrado no banco de RNA-Seq de CPFm de animais do modelo VPA por Qian e colaboradores (Qian et al. 2018), onde o gene alvo para SEMA3G também se encontra diminuído. Além disso, essa família de proteínas se mostra relevante para o TEA uma vez que estudos mostram que o gene da SEMA5A é um gene de suscetibilidade para esse transtorno e parece desempenhar um papel na predisposição genética para traços de déficit de sociabilidade encontrados em pacientes (S. A. Kim et al. 2017; Weiss et al. 2009). Além disso, em uma análise com camundongos homozigotos nulos para SEMA3F os animais apresentaram comportamento semelhante ao TEA (Li et al. 2019). Dessa forma, as semaforinas parecem ser moléculas promissoras de regulação de vias cruciais envolvidas na fisiopatologia do TEA.

7. CONCLUSÕES

Esse trabalho traz novas abordagens para a avaliação dos níveis de miRNA em uma idade jovem em diferentes tecidos obtidos a partir de um modelo animal de autismo, explorando as funções dessas pequenas moléculas na etiologia do TEA.

Dentre o conjunto de 18 miRNA avaliados, foram encontrados 5 miRNA alterados: miR195-5p (diminuído na região da amígdala), miR30c-5p (aumentado na área somatossensorial primária), miR132-3p (aumentado no córtex pré-frontal medial e no cerebelo), miR146a-5p (aumentado no córtex pré-frontal medial) e miR181a-5p (aumentado no cerebelo). Porém, são necessários estudos futuros explorando as alterações moleculares induzidas pela exposição ao VPA durante a embriogênese e seus efeitos a longo prazo na prole, com ênfase na modulação epigenética como um possível mediador do desencadeamento dos fenótipos de TEA.

Além disso, a análise de miRNA traz grandes perspectivas para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas e na busca por biomarcadores para diagnóstico do TEA, uma vez que essas pequenas moléculas podem estar presentes na circulação periférica e podem ter um padrão de expressão específico para o TEA, gerando uma assinatura biológica para esse transtorno. Uma vez que esse conjunto seja confirmado por estudos subsequentes, é possível que essas moléculas possam ser úteis no acompanhamento de estratégias terapêuticas para a observação se a melhora comportamental clínica é acompanhada pela normalização dos níveis dessas pequenas moléculas na periferia. Dessa forma, o estudo de miRNA no TEA, bem como em modelos animais como o modelo por exposição pré-natal ao VPA, são estratégias promissoras para diversos aspectos do TEA, não só para diagnóstico, mas também para acompanhamento e ferramentas terapêuticas para esse transtorno.

8. PERSPECTIVAS

Os resultados da análise de um conjunto de microRNA no modelo animal de autismo induzido por exposição pré-natal ao ácido valproico demonstram um claro envolvimento das vias de sinalização canônica da Wnt/ β -Catenina e não-canônica Wnt/PCP no TEA. Dessa forma, abrem-se perspectivas no sentido de ampliar um possível papel destas vias durante o período embrionário, logo após a indução do modelo, que ocorre no dia E12,5. Com a estratégia preventiva do RSV no comportamento do tipo autista, será possível investigar diferentes pontos das vias canônicas e não canônicas (expressão gênica e proteica), para verificar quais alvos possam estar modificados em decorrência da exposição ao VPA e quais destes foram prevenidos por RSV. Esses estudos abrirão caminhos para novos alvos farmacológicos e ampliarão a compreensão da fisiopatologia do TEA.

9. REFERÊNCIAS

- Abdallah, Morsi W. et al. 2012. "Neonatal Levels of Cytokines and Risk of Autism Spectrum Disorders: An Exploratory Register-Based Historic Birth Cohort Study Utilizing the Danish Newborn Screening Biobank." *Journal of Neuroimmunology* 252(1–2): 75–82.
- Abdallah, Morsi W et al. 2013. "Amniotic Fluid Inflammatory Cytokines : Potential Markers of Immunologic Dysfunction in Autism Spectrum Disorders." *The World Journal of Biological Psychiatry* (May): 528–38.
- ABRA. "ABRA." <http://www.autismo.org.br> (January 20, 2020).
- Abu-Elneel, Kawther et al. 2008. "Heterogeneous Dysregulation of MicroRNAs across the Autism Spectrum." *Neurogenetics* 9(3): 153–61.
- Aldinger, K A et al. 2012. "Cerebellar and Posterior Fossa Malformations in Patients with Autism-Associated Chromosome 22q13 Terminal Deletion." *Am J Med Genet A* 161A(1): 131–36.
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=23225497.
- Alto, Laura Taylor, and Jonathan R. Terman. 2017. "Semaphorins and Their Signaling Mechanisms." *Methods in Molecular Biology*.
- Ambros, Victor. 2004. "The Functions of Animal MicroRNAs." *Nature* 431(7006): 350–55.
- B.J., O’Roak et al. 2012. "Sporadic Autism Exomes Reveal a Highly Interconnected Protein Network of de Novo Mutations." *Nature*.
- Baio, Jon et al. 2018. "Prevalence of Autism Spectrum Disorder Among Children Aged 8 Years — Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network, 11 Sites, United States, 2014." *MMWR. Surveillance Summaries* 67(6): 1–23.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29701730> (November 22, 2018).
- Bambini-Junior, Victorio et al. 2011. "Animal Model of Autism Induced by Prenatal Exposure to Valproate: Behavioral Changes and Liver Parameters." *Brain Res* 1408: 8–16.
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=21767826 (May 24, 2018).
- . 2014. "Resveratrol Prevents Social Deficits in Animal Model of Autism Induced by Valproic Acid." *Neuroscience Letters* 583: 176–81.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25263788> (April 11, 2015).
- Barbato, Christian, Corinna Giorgi, Caterina Catalanotto, and Carlo Cogoni. 2008. "Thinking about RNA? MicroRNAs in the Brain." *Mammalian genome : official journal of the International Mammalian Genome Society* 19(7–8): 541–51.
- Barber, J. C.K. et al. 1994. "Adenomatous Polyposis Coli and a Cytogenetic Deletion of Chromosome 5 Resulting from a Maternal Intrachromosomal Insertion." *Journal of Medical Genetics*.
- Baron-Cohen, S. et al. 2000. "The Amygdala Theory of Autism." *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 24(3): 355–64. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10781695> (May 23, 2018).
- Bartel, David P. 2009. "MicroRNAs: Target Recognition and Regulatory Functions." *Cell* 136(2):

- Bauman, M L. 2010. "Medical Comorbidities in Autism: Challenges to Diagnosis and Treatment." *Neurotherapeutics* 7(3): 320–27.
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=20643385.
- Betancur, Catalina, and Joseph D. Buxbaum. 2013. "SHANK3 Haploinsufficiency: A 'Common' but Underdiagnosed Highly Penetrant Monogenic Cause of Autism Spectrum Disorders." *Molecular Autism*.
- Bill, B R, and D H Geschwind. 2009. "Genetic Advances in Autism: Heterogeneity and Convergence on Shared Pathways." *Curr Opin Genet Dev* 19(3): 271–78.
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19477629.
- Borchert, Glen M, William Lanier, and Beverly L Davidson. 2006. "RNA Polymerase III Transcribes Human MicroRNAs." *Nature Structural & Molecular Biology* 13(12): 1097–1101.
- Bosoi, Ciprian M. et al. 2011. "Identification and Characterization of Novel Rare Mutations in the Planar Cell Polarity Gene PRICKLE1 in Human Neural Tube Defects." *Human Mutation*.
- Bristot Silvestrin, Roberta et al. 2013. "Animal Model of Autism Induced by Prenatal Exposure to Valproate: Altered Glutamate Metabolism in the Hippocampus." *Brain Research*.
- Broderick, J A, and P D Zamore. 2011. "MicroRNA Therapeutics." *Gene therapy* 18(12): 1104–10.
- Buckley, Ashura W., and Gregory L. Holmes. 2016. "Epilepsy and Autism." *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*.
- Buckner, Randy L et al. 2011. "The Organization of the Human Cerebellum Estimated by Intrinsic Functional Connectivity." *Journal of neurophysiology*.
- Cao, Xinwei et al. 2006. "Noncoding RNAs in the Mammalian Central Nervous System." *Annual Review of Neuroscience* 29(1): 77–103.
- Caracci, Mario O, Miguel E Ávila, and Giancarlo V De Ferrari. 2016. "Synaptic Wnt/GSK3 β Signaling Hub in Autism." *Neural plasticity* 2016: 9603751.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26881141> (July 17, 2019).
- Casanova, Manuel F. et al. 2006. "Minicolumnar Abnormalities in Autism." *Acta Neuropathologica* 112(3): 287–303.
- Casanova, Manuel F., Daniel P. Buxhoeveden, Andrew E. Switala, and Emil Roy. 2002. "Minicolumnar Pathology in Autism." *Neurology* 58(3): 428–32.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11839843> (July 10, 2019).
- Chen, Caifu et al. 2005. "Real-Time Quantification of MicroRNAs by Stem-Loop RT-PCR." *Nucleic Acids Res* 33(20): e179.
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16314309.
- Chen, Guang, Li Dong Huang, Yi Ming Jiang, and Hussein K. Manji. 1999. "The Mood-Stabilizing Agent Valproate Inhibits the Activity of Glycogen Synthase Kinase-3." *Journal of Neurochemistry*.

- Chen, Jason A. et al. 2015. "The Emerging Picture of Autism Spectrum Disorder: Genetics and Pathology." *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*.
- Chenn, Anjen. 2008. "Wnt/ β -Catenin Signaling in Cerebral Cortical Development." *Organogenesis* 4(2): 76–80.
- Chou, Chia Hua et al. 2018. "The Origin of GSKIP, a Multifaceted Regulatory Factor in the Mammalian Wnt Pathway." *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*.
- Christianson, Arnold L., Nicole Chester, and Jennifer G.R. Kromberg. 1994. "Fetal Valproate Syndrome: Clinical and Neuro-developmental Features in Two Sibling Pairs." *Developmental Medicine & Child Neurology* 36(4): 361–69.
- Courchesne, Eric et al. 2011. "Neuron Number and Size in Prefrontal Cortex of Children with Autism." *JAMA* 306(18): 2001–10.
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=22068992.
- Crippa, Alessandro et al. 2016. "Cortico-Cerebellar Connectivity in Autism Spectrum Disorder: What Do We Know so Far?" *Frontiers in Psychiatry*.
- Davis-Dusenbery, Brandi N, and Akiko Hata. 2010. "Mechanisms of Control of MicroRNA Biogenesis." *Journal of biochemistry* 148(4): 381–92.
- Dema, Alessandro et al. 2016. "The A-Kinase Anchoring Protein (AKAP) Glycogen Synthase Kinase 3 β Interaction Protein (GSKIP) Regulates β -Catenin through Its Interactions with Both Protein Kinase A (PKA) and GSK3 β ." *Journal of Biological Chemistry*.
- Dickie, Erin W., and Jorge L. Armony. 2008. "Amygdala Responses to Unattended Fearful Faces: Interaction between Sex and Trait Anxiety." *Psychiatry Research - Neuroimaging* 162(1): 51–57.
- Diederich, Marc, Sébastien Chateauvieux, Franck Morceau, and Mario Dicato. 2010. "Molecular and Therapeutic Potential and Toxicity of Valproic Acid." *Journal of Biomedicine and Biotechnology*.
- Doench, John G, and Phillip A Sharp. 2004. "Specificity of MicroRNA Target Selection in Translational Repression." *Genes & development* 18(5): 504–11.
- Dover, Clare J, and Ann Le Couteur. 2007. "How to Diagnose Autism." *Arch Dis Child* 92: 540–45.
- Fang, Wei-Qun et al. 2014. "Overproduction of Upper-Layer Neurons in the Neocortex Leads to Autism-like Features in Mice." *Cell Reports* 9(5): 1635–43.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25466248> (July 17, 2019).
- Favre, MR Mônica R et al. 2013. "General Developmental Health in the VPA-Rat Model of Autism." *Frontiers in behavioral neuroscience* 7: 88.
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3721005&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> (September 4, 2015).
- Filipowicz, Witold, Suvendra N Bhattacharyya, and Nahum Sonenberg. 2008. "Mechanisms of Post-Transcriptional Regulation by MicroRNAs: Are the Answers in Sight?" *Nature reviews. Genetics* 9(2): 102–14.
- Fontes-Dutra, Mellanie et al. 2018. "Resveratrol Prevents Cellular and Behavioral Sensory Alterations in the Animal Model of Autism Induced by Valproic Acid." *Frontiers in Synaptic Neuroscience* 10: 9. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29872390> (July 10,

2019).

- Friedman, R. C., K. K.-H. Farh, C. B. Burge, and D. P. Bartel. 2008. "Most Mammalian MRNAs Are Conserved Targets of MicroRNAs." *Genome Research* 19(1): 92–105.
- Geschwind, Daniel H. 2009. "Advances in Autism." *Annu Rev Med* 60: 367–80.
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19630577.
- Gilbert, James, and Heng-Ye Man. 2017. "Fundamental Elements in Autism: From Neurogenesis and Neurite Growth to Synaptic Plasticity." *Frontiers in Cellular Neuroscience*.
- Gilman, Sarah R. et al. 2011. "Rare De Novo Variants Associated with Autism Implicate a Large Functional Network of Genes Involved in Formation and Function of Synapses." *Neuron*.
- Glessner, Joseph T. et al. 2009. "Autism Genome-Wide Copy Number Variation Reveals Ubiquitin and Neuronal Genes." *Nature*.
- Go, Hyo Sang et al. 2012. "Prenatal Exposure to Valproic Acid Increases the Neural Progenitor Cell Pool and Induces Macrocephaly in Rat Brain via a Mechanism Involving the GSK-3 β /Catenin Pathway." *Neuropharmacology* 63(6): 1028–41.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22841957> (July 17, 2019).
- Gottfried, Carmem et al. 2013. "Valproic Acid in Autism Spectrum Disorder : From an Environmental Risk Factor to a Reliable Animal Model."
- Grandin, T. 2009. "Visual Abilities and Sensory Differences in a Person with Autism." *Biol Psychiatry* 65(1): 15–16.
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19064037.
- Greco, Claudia M. et al. 2011. "Neuropathologic Features in the Hippocampus and Cerebellum of Three Older Men with Fragile X Syndrome." *Molecular Autism*.
- Grimson, Andrew et al. 2007. "MicroRNA Targeting Specificity in Mammals: Determinants beyond Seed Pairing." *Molecular cell* 27(1): 91–105.
- Guang, Shiqi et al. 2018. "Synaptopathology Involved in Autism Spectrum Disorder." *Frontiers in Cellular Neuroscience*.
- Guo, Xiaonan et al. 2016. "Decreased Amygdala Functional Connectivity in Adolescents with Autism: A Resting-State FMRI Study." *Psychiatry Research - Neuroimaging* 257(March): 47–56.
- Hall, Anita C. et al. 2002. "Valproate Regulates GSK-3-Mediated Axonal Remodeling and Synapsin I Clustering in Developing Neurons." *Molecular and Cellular Neuroscience*.
- Hansen, Katelin F. et al. 2010. "Transgenic MiR132 Alters Neuronal Spine Density and Impairs Novel Object Recognition Memory." *PLoS ONE*.
- Haws, Michael E. et al. 2014. "PTEN Knockdown Alters Dendritic Spine/Protrusion Morphology, Not Density." *Journal of Comparative Neurology*.
- He, Sha et al. 2015. "Wnt3a: Functions and Implications in Cancer." *Chinese journal of cancer*.
- Hicks, Steven D., Cherry Ignacio, Karen Gentile, and Frank A. Middleton. 2016. "Salivary MiRNA Profiles Identify Children with Autism Spectrum Disorder, Correlate with Adaptive Behavior, and Implicate ASD Candidate Genes Involved in Neurodevelopment." *BMC*

- Hida, Yamato et al. 2011. "Prickle2 Is Localized in the Postsynaptic Density and Interacts with PSD-95 and NMDA Receptors in the Brain." *Journal of Biochemistry*.
- Hirsch, Mauro Mozael et al. 2018. "Behavioral Alterations in Autism Model Induced by Valproic Acid and Translational Analysis of Circulating MicroRNA." *Food and Chemical Toxicology* 115: 336–43.
- Hosie, Suzanne et al. 2018. "Altered Amygdala Excitation and CB1 Receptor Modulation of Aggressive Behavior in the Neuroligin-3R451C Mouse Model of Autism." *Frontiers in Cellular Neuroscience*.
- Hsu, Sheng-Da et al. 2011. "MiRTarBase: A Database Curates Experimentally Validated MicroRNA-Target Interactions." *Nucleic acids research* 39(Database issue): D163-9. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21071411> (November 21, 2018).
- Huang, Fengzhen et al. 2015. "Investigation of Gene Regulatory Networks Associated with Autism Spectrum Disorder Based on MiRNA Expression in China." *PLoS ONE*.
- Huang, Xiaojing et al. 2018. "Wnt7a Activates Canonical Wnt Signaling, Promotes Bladder Cancer Cell Invasion, and Is Suppressed by MIR-370-3p." *Journal of Biological Chemistry*.
- Huerta, Marisela, and Catherine Lord. 2012. "Diagnostic Evaluation of Autism Spectrum Disorders." *Pediatr Clin North Am* 59(1): 103–11, xi. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=22284796.
- Hundsrucker, Christian et al. 2010. "Glycogen Synthase Kinase 3 β Interaction Protein Functions as an A-Kinase Anchoring Protein." *Journal of Biological Chemistry*.
- Hutsler, J J, and M F Casanova. 2016. "Review: Cortical Construction in Autism Spectrum Disorder: Columns, Connectivity and the Subplate." *Neuropathology and Applied Neurobiology* 42: 115–34.
- Hutsler, Jeffrey J., and Hong Zhang. 2010. "Increased Dendritic Spine Densities on Cortical Projection Neurons in Autism Spectrum Disorders." *Brain research* 1309: 83–94. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19896929.
- Ingraham, Christopher A., Gabriel C. Park, Helen P. Makarenkova, and Kathryn L. Crossin. 2011. "Matrix Metalloproteinase (MMP)-9 Induced by Wnt Signaling Increases the Proliferation and Migration of Embryonic Neural Stem Cells at Low O₂ Levels." *Journal of Biological Chemistry*.
- Ingram, Jennifer L., Stacey M. Peckham, Barbara Tisdale, and Patricia M. Rodier. 2000. "Prenatal Exposure of Rats to Valproic Acid Reproduces the Cerebellar Anomalies Associated with Autism." *Neurotoxicology and Teratology* 22(3): 319–24. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10840175.
- Iossifov, Ivan et al. 2014. "The Contribution of de Novo Coding Mutations to Autism Spectrum Disorder." *Nature*.
- Jiang, Hao et al. 2009. "Resveratrol Downregulates PI3K/Akt/MTOR Signaling Pathways in Human U251 Glioma Cells." *Journal of experimental therapeutics & oncology* 8(1): 25–33. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19827268> (July 17, 2019).

- Jiang, Yong hui, and Michael D. Ehlers. 2013. "Modeling Autism by SHANK Gene Mutations in Mice." *Neuron*.
- Jung, Gyung Ah et al. 2008. "Valproic Acid Induces Differentiation and Inhibition of Proliferation in Neural Progenitor Cells via the Beta-Catenin-Ras-ERK- P21 Cip/WAF1 Pathway." *BMC Cell Biology*.
- Kalkman, Hans Otto. 2012. "A Review of the Evidence for the Canonical Wnt Pathway in Autism Spectrum Disorders." *Molecular Autism*.
- Kamal, Mohammad A., Gohar Mushtaq, and Nigel H. Greig. 2015. "Current Update on Synopsis of MiRNA Dysregulation in Neurological Disorders." *CNS & neurological disorders drug targets* 14(4): 492–501.
- Kataoka, Shunsuke et al. 2013. "Autism-like Behaviours with Transient Histone Hyperacetylation in Mice Treated Prenatally with Valproic Acid." *International Journal of Neuropsychopharmacology* 16(1): 91–103.
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=22093185.
- Kedde, Martijn et al. 2007. "RNA-Binding Protein Dnd1 Inhibits MicroRNA Access to Target MRNA." *Cell* 131(7): 1273–86.
- Kern, J K et al. 2007. "Sensory Correlations in Autism." *Autism* 11(2): 123–34.
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17353213.
- Kichukova, Tatyana M., Nikolay T. Popov, Ivan S. Ivanov, and Tihomir I. Vachev. 2017. "Profiling of Circulating Serum MicroRNAs in Children with Autism Spectrum Disorder Using Stem-Loop QRT-PCR Assay." *Folia medica*.
- Kim, Ki Chan et al. 2016. "MeCP2 Modulates Sex Differences in the Postsynaptic Development of the Valproate Animal Model of Autism." *Molecular Neurobiology*.
- Kim, Soon Ae et al. 2017. "Polymorphism in the Promoter Region of SEMA5A Is Associated with Sociality Traits in Korean Subjects with Autism Spectrum Disorders." *Psychiatry Investigation*.
- Klintwall, Lars et al. 2011. "Sensory Abnormalities in Autism." *Research in Developmental Disabilities* 32(2): 795–800.
- Kosik, Kenneth S. 2006. "The Neuronal MicroRNA System." *Nature Reviews Neuroscience* 7(12): 911–20.
- Krumm, Niklas, Brian J. O’Roak, Jay Shendure, and Evan E. Eichler. 2014. "A de Novo Convergence of Autism Genetics and Molecular Neuroscience." *Trends in Neurosciences*.
- Kwan, Vickie, Brianna K Unda, and Karun K Singh. 2016. "Wnt Signaling Networks in Autism Spectrum Disorder and Intellectual Disability." *Journal of neurodevelopmental disorders* 8: 45. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27980692> (July 17, 2019).
- Kweon, Soo Mi et al. 2016. "Wnt Pathway Stabilizes MeCP2 Protein to Repress PPAR-γ in Activation of Hepatic Stellate Cells." *PLoS ONE*.
- Kwon, Chang-Hyuk et al. 2006. "Pten Regulates Neuronal Arborization and Social Interaction in Mice." *Neuron* 50(3): 377–88. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16675393> (July 17, 2019).

- Lawrence, Y. A., T. L. Kemper, M. L. Bauman, and G. J. Blatt. 2010. "Parvalbumin-, Calbindin-, and Calretinin-Immunoreactive Hippocampal Interneuron Density in Autism." *Acta Neurologica Scandinavica* 121(2): 99–108.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19719810> (July 10, 2019).
- Leblond, Claire S. et al. 2014. "Meta-Analysis of SHANK Mutations in Autism Spectrum Disorders: A Gradient of Severity in Cognitive Impairments." *PLoS Genetics*.
- Lee, R C, R L Feinbaum, and V Ambros. 1993. "The C. Elegans Heterochronic Gene Lin-4 Encodes Small RNAs with Antisense Complementarity to Lin-14." *Cell* 75(5): 843–54.
- Li, Zhu, Rekha Jagadapillai, Evelyne Gozal, and Gregory Barnes. 2019. "Deletion of Semaphorin 3F in Interneurons Is Associated with Decreased GABAergic Neurons, Autism-like Behavior, and Increased Oxidative Stress Cascades." *Molecular Neurobiology*.
- Liu, Jidong. 2008. "Control of Protein Synthesis and mRNA Degradation by MicroRNAs." *Current Opinion in Cell Biology* 20(2): 214–21.
- Livak, K J, and T D Schmittgen. 2001. "Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method." *Methods (San Diego, Calif.)* 25(4): 402–8.
- Lotan, Amit et al. 2014. "Neuroinformatic Analyses of Common and Distinct Genetic Components Associated with Major Neuropsychiatric Disorders." *Frontiers in Neuroscience*.
- Luikart, Bryan W. et al. 2011. "Pten Knockdown in Vivo Increases Excitatory Drive onto Dentate Granule Cells." *Journal of Neuroscience*.
- Lyu, Jing Wen et al. 2016. "Reciprocal Regulation of Autism-Related Genes MeCP2 and PTEN via MicroRNAs." *Scientific Reports*.
- MacDonald, Bryan T., Keiko Tamai, and Xi He. 2009. "Wnt/ β -Catenin Signaling: Components, Mechanisms, and Diseases." *Developmental Cell*.
- Mak, Baldwin C. et al. 2003. "The Tuberin-Hamartin Complex Negatively Regulates β -Catenin Signaling Activity." *Journal of Biological Chemistry* 278(8): 5947–51.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12511557> (July 17, 2019).
- Mak, Baldwin C et al. 2005. "Aberrant Beta-Catenin Signaling in Tuberous Sclerosis." *The American journal of pathology* 167(1): 107–16.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15972957> (July 17, 2019).
- Marchezam, Josemar. 2018. "Transtorno Do Espectro Autista e Neuroinflamação: Busca Por Biomarcadores e Alvos Terapêuticos." Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- Martin, P. M. et al. 2013. "A Rare WNT1 Missense Variant Overrepresented in ASD Leads to Increased Wnt Signal Pathway Activation." *Translational psychiatry*.
- Mefford, Heather C, Mark L Batshaw, and Eric P Hoffman. 2012. "Genomics, Intellectual Disability, and Autism." *N Engl J Med* 366(8): 733–43.
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=22356326.
- Moessner, Rainald et al. 2007. "Contribution of SHANK3 Mutations to Autism Spectrum Disorder." *The American Journal of Human Genetics*.
- Moldrich, Randal X. et al. 2013. "Inhibition of Histone Deacetylase in Utero Causes Sociability

- Deficits in Postnatal Mice.” *Behavioural Brain Research*.
- Moore, S J et al. 2000. “A Clinical Study of 57 Children with Fetal Anticonvulsant Syndromes.” *J Med Genet* 37: 489–97.
- Mor, Michal, Stefano Nardone, Dev Sharan Sams, and Evan Elliott. 2015. “Hypomethylation of MiR-142 Promoter and Upregulation of MicroRNAs That Target the Oxytocin Receptor Gene in the Autism Prefrontal Cortex.” *Molecular Autism*.
- Mulligan, Kimberly A., and Benjamin N.R. Cheyette. 2016. “Neurodevelopmental Perspectives on Wnt Signaling in Psychiatry.” *Molecular Neuropsychiatry*.
- Mundalil Vasu, Mahesh et al. 2014. “Serum MicroRNA Profiles in Children with Autism.” *Molecular Autism*.
- Munji, R. N. et al. 2011. “Wnt Signaling Regulates Neuronal Differentiation of Cortical Intermediate Progenitors.” *Journal of Neuroscience*.
- Nagarajan, Raman P. et al. 2006. “Reduced MeCP2 Expression Is Frequent in Autism Frontal Cortex and Correlates with Aberrant MECP2 Promoter Methylation.” *Epigenetics*.
- Naisbitt, Scott et al. 1999. “Shank, a Novel Family of Postsynaptic Density Proteins That Binds to the NMDA Receptor/PSD-95/GKAP Complex and Cortactin.” *Neuron*.
- Nicolini, Chiara et al. 2015. “Decreased MTOR Signaling Pathway in Human Idiopathic Autism and in Rats Exposed to Valproic Acid.” *Acta neuropathologica communications*.
- Nicolini, Chiara, and Margaret Fahnestock. 2018. 299 Experimental Neurology *The Valproic Acid-Induced Rodent Model of Autism*. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28472621> (July 10, 2019).
- Noelanders, Rivka, and Kris Vleminckx. 2017. “How Wnt Signaling Builds the Brain: Bridging Development and Disease.” *Neuroscientist*.
- O’Loughlin, Elaine, Janelle M.P. Pakan, Deniz Yilmazer-Hanke, and Kieran W. McDermott. 2017. “Acute in Utero Exposure to Lipopolysaccharide Induces Inflammation in the Pre- and Postnatal Brain and Alters the Glial Cytoarchitecture in the Developing Amygdala.” *Journal of Neuroinflammation*.
- O’Roak, Brian J. et al. 2012. “Sporadic Autism Exomes Reveal a Highly Interconnected Protein Network of de Novo Mutations.” *Nature*.
- Okamura, Katsutomo et al. 2008. “The Regulatory Activity of MicroRNA* Species Has Substantial Influence on MicroRNA and 3’ UTR Evolution.” *Nature structural & molecular biology* 15(4): 354–63.
- Paemka, Lily et al. 2013. “PRICKLE1 Interaction with SYNAPSIN I Reveals a Role in Autism Spectrum Disorders.” *PLoS ONE*.
- Parisi, Melissa A., and William B. Dobyns. 2003. “Human Malformations of the Midbrain and Hindbrain: Review and Proposed Classification Scheme.” *Molecular Genetics and Metabolism*.
- Peixoto, Rui T. et al. 2012. “Transsynaptic Signaling by Activity-Dependent Cleavage of Neuroligin-1.” *Neuron*.
- Phiel, Christopher J. et al. 2001. “Histone Deacetylase Is a Direct Target of Valproic Acid, a Potent Anticonvulsant, Mood Stabilizer, and Teratogen.” *Journal of Biological Chemistry* 276(39): 36734–41.

- Qian, Zhaoqiang et al. 2018. "RNA-Seq Data on Prefrontal Cortex in Valproic Acid Model of Autism and Control Rats." *Data in Brief*.
- Qin, Liyan, and Xufang Dai. 2015. "Effect of Sulindac on Improving Autistic Behaviors in Rats." *Nan fang yi ke da xue xue bao = Journal of Southern Medical University*.
- Reinhard, Sarah M., Khaleel Razak, and Iryna M. Ethell. 2015. "A Delicate Balance: Role of MMP-9 in Brain Development and Pathophysiology of Neurodevelopmental Disorders." *Frontiers in Cellular Neuroscience*.
- Roullet, F.I., L. Wollaston, D. deCatanzaro, and J.A. Foster. 2010. "Behavioral and Molecular Changes in the Mouse in Response to Prenatal Exposure to the Anti-Epileptic Drug Valproic Acid." *Neuroscience* 170(2): 514–22.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20603192> (October 5, 2015).
- De Rubeis, Silvia, and Joseph D. Buxbaum. 2015. "Recent Advances in the Genetics of Autism Spectrum Disorder." *Current Neurology and Neuroscience Reports*.
- Rubin, Rachael D., Patrick D. Watson, Melissa C. Duff, and Neal J. Cohen. 2014. "The Role of the Hippocampus in Flexible Cognition and Social Behavior." *Frontiers in Human Neuroscience*.
- Sans, Nathalie, Jérôme Ezan, Maïté M. Moreau, and Mireille Montcouquiol. 2016. "Planar Cell Polarity Gene Mutations in Autism Spectrum Disorder, Intellectual Disabilities, and Related Deletion/Duplication Syndromes." *Neuronal and Synaptic Dysfunction in Autism Spectrum Disorder and Intellectual Disability*: 189–219.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128001097000133> (July 15, 2019).
- Sarachana, Tewarit et al. 2010. "Investigation of Post-Transcriptional Gene Regulatory Networks Associated with Autism Spectrum Disorders by MicroRNA Expression Profiling of Lymphoblastoid Cell Lines." *Genome medicine* 2(4): 23.
- Saugstad, Julie A. 2010. "MicroRNAs as Effectors of Brain Function with Roles in Ischemia and Injury, Neuroprotection, and Neurodegeneration." *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 30(9): 1564–76.
- Schneider, T et al. 2008. "Gender-Specific Behavioral and Immunological Alterations in an Animal Model of Autism Induced by Prenatal Exposure to Valproic Acid." *Psychoneuroendocrinology* 33(6): 728–40.
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18396377.
- Schneider, Tomasz, R Przewlocki, and Ryszard Przewlocki. 2005. "Behavioral Alterations in Rats Prenatally Exposed to Valproic Acid: Animal Model of Autism." *Neuropsychopharmacology* 30(1): 80–89.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15238991> (May 23, 2015).
- Schratt, Gerhard M. et al. 2006. "A Brain-Specific MicroRNA Regulates Dendritic Spine Development." *Nature* 439(7074): 283–89.
- Siegel, Gabriele et al. 2009. "A Functional Screen Implicates MicroRNA-138-Dependent Regulation of the Depalmitoylation Enzyme APT1 in Dendritic Spine Morphogenesis." *Nature cell biology* 11(6): 705–16.
- Silver, Wendy G., and Isabelle Rapin. 2012. "Neurobiological Basis of Autism." *Pediatr Clin*

- North Am 59(1): 45–61, x.
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=22284792.
- De Smaele, Enrico, Elisabetta Ferretti, and Alberto Gulino. 2010. "MicroRNAs as Biomarkers for CNS Cancer and Other Disorders." *Brain Research* 1338: 100–111.
- Smeets, E. E.J., K. Pelc, and B. Dan. 2012. "Rett Syndrome." *Molecular Syndromology*.
- Snijders, Tineke M., Branka Milivojevic, and Chantal Kemner. 2013. "Atypical Excitation-Inhibition Balance in Autism Captured by the Gamma Response to Contextual Modulation." *NeuroImage: Clinical* 3: 65–72.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2213158213000831> (July 10, 2019).
- Song, Lin, and Rocky S. Tuan. 2006. "MicroRNAs and Cell Differentiation in Mammalian Development." *Birth Defects Research Part C - Embryo Today: Reviews*.
- Sowers, L P et al. 2013. "Disruption of the Non-Canonical Wnt Gene PRICKLE2 Leads to Autism-like Behaviors with Evidence for Hippocampal Synaptic Dysfunction." *Molecular Psychiatry* 18(10): 1077–89. <http://www.nature.com/articles/mp201371> (July 17, 2019).
- Sparks, B. F. et al. 2002. "Brain Structural Abnormalities in Young Children with Autism Spectrum Disorder." *Neurology* 59(2): 184–92.
- Ssucharewa, G.E. 1926. "Die Schizoiden Psychopathien Im Kindesalter. (Part 1 of 2)." *European Neurology* 60(3–4): 235–47.
- Stoner, Rich et al. 2014. "Patches of Disorganization in the Neocortex of Children with Autism." *New England Journal of Medicine* 370(13): 1209–19.
<http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa1307491> (July 9, 2019).
- Subramanian, Megha et al. 2015. "Characterizing Autism Spectrum Disorders by Key Biochemical Pathways." *Frontiers in Neuroscience*.
- T.N., Turner et al. 2016. "Genome Sequencing of Autism-Affected Families Reveals Disruption of Putative Noncoding Regulatory DNA." *American Journal of Human Genetics*.
- Talebizadeh, Zohreh, Merlin G. Butler, and Mariana F. Theodoro. 2008. "Feasibility and Relevance of Examining Lymphoblastoid Cell Lines to Study Role of MicroRNAs in Autism." *Autism Research: Official Journal of the International Society for Autism Research* 1(4): 240–50.
- Tammimies, Kristiina. 2019. "Genetic Mechanisms of Regression in Autism Spectrum Disorder." *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 102(May): 208–20.
<https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2019.04.022>.
- Tao, Hirotaka et al. 2011. "Mutations in Prickle Orthologs Cause Seizures in Flies, Mice, and Humans." *American Journal of Human Genetics*.
- Tilot, Amanda K., Thomas W. Frazier, and Charis Eng. 2015. "Balancing Proliferation and Connectivity in PTEN-Associated Autism Spectrum Disorder." *Neurotherapeutics*.
- Tognini, Paola, and Tommaso Pizzorusso. 2012. "MicroRNA212/132 Family: Molecular Transducer of Neuronal Function and Plasticity." *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*.
- Tsai, Peter T. 2016. "Autism and Cerebellar Dysfunction: Evidence from Animal Models." *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine*.

- Vafadari, Behnam, Ahmad Salamian, and Leszek Kaczmarek. 2016. "MMP-9 in Translation: From Molecule to Brain Physiology, Pathology, and Therapy." *Journal of Neurochemistry*.
- Varghese, Merina et al. 2017. "Autism Spectrum Disorder: Neuropathology and Animal Models." *Acta Neuropathologica*.
- Wang, Li et al. 2015. "Wnt Signaling Pathway Participates in Valproic Acid-Induced Neuronal Differentiation of Neural Stem Cells." *International journal of clinical and experimental pathology* 8(1): 578–85. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25755748> (July 17, 2019).
- Wang, Zhongping et al. 2010. "Demethylation of Specific Wnt/ β -Catenin Pathway Genes and Its Upregulation in Rat Brain Induced by Prenatal Valproate Exposure." *The Anatomical Record: Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology* 293(11): 1947–53. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20734317> (July 17, 2019).
- Wassink, Thomas H. et al. 2013. "Evidence Supporting WNT2 as an Autism Susceptibility Gene." In *The Science of Mental Health: Volume 2: Autism*,.
- Wayman, Gary A. et al. 2008. "An Activity-Regulated MicroRNA Controls Dendritic Plasticity by down-Regulating P250GAP." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105(26): 9093–98.
- Wegiel, Jerzy et al. 2010. "The Neuropathology of Autism: Defects of Neurogenesis and Neuronal Migration, and Dysplastic Changes." *Acta Neuropathologica*.
- Weiss, Lauren A. et al. 2009. "A Genome-Wide Linkage and Association Scan Reveals Novel Loci for Autism." *Nature*.
- Williams, Gail et al. 2001. "Fetal Valproate Syndrome and Autism: Additional Evidence of an Association." *Developmental Medicine and Child Neurology* 43(3): 202–6.
- Williams, P Gail, and Joseph H. Hersh. 1997. "A Male with Fetal Valproate Syndrome and Autism." *Developmental Medicine & Child Neurology* 39(9): 632–34.
- Wiltse, Jeanette. 2005. "Mode of Action: Inhibition of Histone Deacetylase, Altering WNT-Dependent Gene Expression, and Regulation of Beta-Catenin--Developmental Effects of Valproic Acid." *Critical reviews in toxicology* 35(8–9): 727–38. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16417040> (July 17, 2019).
- Winden, Kellen D., Darius Ebrahimi-Fakhari, and Mustafa Sahin. 2018. "Abnormal MTOR Activation in Autism." *Annual Review of Neuroscience* 41(1): 1–23. <https://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-neuro-080317-061747> (July 17, 2019).
- Winter, Julia et al. 2009. "Many Roads to Maturity: MicroRNA Biogenesis Pathways and Their Regulation." *Nature Cell Biology* 11(3): 228–34.
- Won, Hyejung, Won Mah, and Eunjoon Kim. 2013. "Autism Spectrum Disorder Causes, Mechanisms, and Treatments: Focus on Neuronal Synapses." *Frontiers in molecular neuroscience* 6: 19. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23935565> (July 10, 2019).
- Wong, Christine T., Isabel Bestard-Lorigados, and Dorota A. Crawford. 2019. "Autism-Related Behaviors in the Cyclooxygenase-2-Deficient Mouse Model." *Genes, Brain and Behavior*.
- Yang, Eun-Jeong et al. 2016. "Early Behavioral Abnormalities and Perinatal Alterations of PTEN/AKT Pathway in Valproic Acid Autism Model Mice" ed. Valerie W Hu. *PLOS ONE* 11(4): e0153298.

- Yang, Weidong et al. 2006. "Modulation of MicroRNA Processing and Expression through RNA Editing by ADAR Deaminases." *Nature structural & molecular biology* 13(1): 13–21.
- Yi, Rui et al. 2005. "Overexpression of Exportin 5 Enhances RNA Interference Mediated by Short Hairpin RNAs and MicroRNAs." *RNA (New York, N.Y.)* 11(2): 220–26.
- Zeldovich, L. 2018. "How History Forgot the Woman Who Defined Autism - Scientific American." *Scientific American*.
- Zhang, Yinghua et al. 2012a. "Downregulating the Canonical Wnt/b-Catenin Signaling Pathway Attenuates the Susceptibility to Autism-like Phenotypes by Decreasing Oxidative Stress." *Neurochemical Research*.
- . 2012b. "Downregulating the Canonical Wnt/ β -Catenin Signaling Pathway Attenuates the Susceptibility to Autism-like Phenotypes by Decreasing Oxidative Stress." *Neurochemical Research* 37(7): 1409–19.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22374471> (July 17, 2019).
- Zhou, Xiao Lei et al. 2007. "Association of Adenomatous Polyposis Coli (APC) Gene Polymorphisms with Autism Spectrum Disorder (ASD)." *American Journal of Medical Genetics, Part B: Neuropsychiatric Genetics*.
- Zhou, Yang et al. 2019. "Atypical Behaviour and Connectivity in SHANK3-Mutant Macaques." *Nature* 570(7761): 326–31. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31189958> (July 10, 2019).
- Zikopoulos, Basilis, and Helen Barbas. 2013. "Altered Neural Connectivity in Excitatory and Inhibitory Cortical Circuits in Autism." *Frontiers in Human Neuroscience* 7: 609.
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=24098278.

11. ANEXO 1

Carta de aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) Projeto 23884

	U F R G S UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL	PRÓ-REITORIA DE PESQUISA Comissão De Ética No Uso De Animais	
---	--	--	---

CARTA DE APROVAÇÃO

Comissão De Ética No Uso De Animais analisou o projeto:

Número: 23884
Título: MODELO DE AUTISMO INDUZIDO POR ACIDO VALPROICO EM RATOS WISTAR: ESTUDO DA ETIOLOGIA, TRATAMENTO E MARCADORES CLINICOS

Pesquisadores:
Equipe UFRGS:

CARMEM JURACY SILVEIRA GOTTFRIED - coordenador desde 22/09/2012
RUDIMAR DOS SANTOS RIESGO - pesquisador desde 22/09/2012
Victorio Bambini Junior - Aluno de Doutorado desde 22/09/2012

Comissão De Ética No Uso De Animais aprovou o mesmo em seus aspectos éticos e metodológicos, para a utilização de 80 ratos Wistar (fêmeas e machos), de acordo com as Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08 de novembro de 2008 que disciplina a criação e utilização de animais em atividades de ensino e pesquisa.

Porto Alegre, Sexta-Feira, 28 de Junho de 2013


STELA MARIS KUZE RATES
Coordenador da comissão de ética